

ARISTEU VIEIRA DA SILVA

Avaliação da infecção de ratos Fischer com duas amostras geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii*: cinética de anticorpos, reisolamento em camundongos e reação em cadeia pela polimerase

Botucatu - SP

2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Avaliação da infecção de ratos Fischer com duas amostras geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii*: cinética de anticorpos, reisolamento em camundongos e reação em cadeia pela polimerase

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Modalidade Biologia Tropical, para obtenção do título de Doutor

Aluno: **Aristeu Vieira da Silva**

Orientador: **Prof. Adjunto Helio Langoni**

Botucatu - SP

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Silva, Aristeu Vieira da.

Avaliação da infecção de ratos Fischer com duas amostras geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii* : cinética de anticorpos, reisolamento em camundongos e reação em cadeia pela polimerase / Aristeu Vieira da Silva. – 2003.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2003.

Orientador: Helio Langoni

Assunto CAPES: 40101096

1. *Toxoplasma gondii* - Isolamento - Estudos experimentais 2. Parasitologia molecular

CDD 616.94

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; Sorologia; Reisolamento; PCR; Genotipagem; Rato

AGRADECIMENTOS

Muitos foram aqueles que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização deste trabalho. Manifesto minha gratidão a todos eles e de forma particular:

Ao meu orientador, Prof. Helio Langoni, mestre e amigo, que ao depositar sua confiança em mim, honrou-me com diversas responsabilidades que só fizeram favorecer ainda mais meu desenvolvimento profissional.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela concessão da Bolsa de Estudos que permitiu a realização deste projeto a contento.

Ao Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, pela utilização irrestrita de todas as dependências do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses.

Aos funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, em especial a D.Zeza, a Adriana, ao Fernando e ao Wanderley, que em muito momentos auxiliaram para o bom andamento desta tese.

Ao Hedeferson, que diligentemente cuidou para que muito da vidraria e materiais utilizados nesta tese fossem convenientemente preparados.

Ao Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, por contribuir para o meu desenvolvimento profissional.

Ao Carlinhos, do Laboratório de Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina de Botucatu, por sempre estar disposto a colaborar, principalmente no fornecimento de camundongos para nossos trabalhos.

À bibliotecária Elza Numata, da Seção de Aquisição e Tratamento da Informação, Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação, UNESP, Campus Botucatu, pela elaboração da ficha catalográfica para este trabalho, bem como pelas sugestões para alteração da capa e da página de rosto.

Aos colegas da pós-graduação em Doenças Tropicais, pelos momentos de intenso trabalho intelectual nas várias disciplinas cursadas, assim como pelos agradáveis momentos de descontração, em especial a amiga Maria do Socorro, pelas discussões em torno da toxoplasmose.

Às queridas Mestras Profa. Dra. Teresinha Peraçoli e Profa. Dra. Jussara Marcondes-Machado, pelas excelentes disciplinas oferecidas durante o curso de pós-graduação, bem como pelas valiosas sugestões à redação final desta tese, no momento do Exame Geral de Qualificação.

Ao Prof.Dr. José Roberto Mineo, do Laboratório de Imunologia, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Uberlândia, por ter gentilmente cedido a cepa ME-49 de *T.gondii*, utilizada neste trabalho, assim como ao Prof. Alvaro Freyre, do Laboratorio de Toxoplasmosis, Departamento de Parasitologia Veterinaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica, Montevideo, por gentilmente ceder a cepa M7741 de *T.gondii*, o que permitiu a padronização da técnica da genotipagem.

Aos Prof.Ass.Dr. Antonio Carlos Paes e Prof.Ass.Dr. Marcio Garcia Ribeiro, pela oportunidade do convívio diário e auxílio quando se fez necessário.

Aos residentes da Área de Zoonoses e Saúde Pública, pela ajuda na manutenção dos animais experimentais e pela disponibilidade constante em ajudar nas mais diversas tarefas que lhes foram solicitadas. Ao residente Leandro, da área de Doenças Infecciosas dos Animais, que entendeu a proposta de trabalho com a toxoplasmose canina, permitindo em última instância o isolamento de diversas cepas de *T.gondii*, inclusive a BTU-2, utilizada nesta tese.

Aos queridos amigos Sandia, Acácia e Cassiano, pelo companherismo diário e pela ajuda em todas as horas que foram necessárias.

A minha família, que mesmo distante me apoia e tem orgulho do “último do mineiros”, e aos meus sogros, que se tornaram pais, e ainda mais, amigos de todas as horas.

A minha esposa, Maria Anastácia, companheira querida e carinhosa, que entende e apoia mais do que ninguém meus propósitos.

Ó mar anterior a nós, teus medos
Tinham coral e praias e arvoredos.
Desvendadas a noite e a cerração,
As tormentas passadas e o mysterio,
Abria em flor o Longe, e o Sul siderio
Splendia sobre as naus da iniciação.

Linha severa da longinqua costa –
Quando a nau se aproxima erque-se a encosta
Em árvores onde o Longe nada tinha;
Mais perto, abre-se a terra em sons e cores:
E, no desembarcar, ha aves, flores,
Onde era só, de longe a abstracta linha

O sonho é ver as fórm as invisíveis
Da distancia imprecisa, e, com sensíveis
Movimentos de esperança e da vontade,
Buscar na linha fria do horizonte
A arvore, a praia, a flor, a ave, a fonte –
Os beijos merecidos da Verdade.

Fernando Pessoa (Mensagem, Mar Portuguez, II. Horizonte)

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Delineamento experimental.....	32
3.2 Animais	33
3.3 Cepas de <i>T.gondii</i>	34
3.4 Obtenção de cistos teciduais	35
3.4.1 Em ratos	35
3.4.2 Em camundongos.....	36
3.4.3 Preparação da suspensão de bradizoítos	37
3.5 Infecção de ratos	38
3.5.1 Colheita de sangue.....	39
3.5.2 Colheita de tecidos	39
3.6 Exame sorológico.....	40
3.6.1 Diluição dos soros	40
3.6.2 Reação de imunofluorescência indireta.....	40
3.6.3 Método de aglutinação direta	41
3.7 Reisolamento em camundongos.....	42
3.8 Reação em cadeia pela polimerase.....	43
3.8.1 Determinação do limiar de detecção	44
3.8.2 Extração de DNA	45
3.8.3 Reação em cadeia pela polimerase.....	46
3.8.4 Eletroforese em gel de agarose para identificação dos produtos amplificados	48
3.9 Genotipagem da cepa BTU-2 de <i>T.gondii</i>	49

3.10	Análise estatística.....	53
4	RESULTADOS	55
4.1	Exame sorológico.....	56
4.2	Reisolamento em camundongos.....	66
4.3	Reação em cadeia pela polimerase.....	69
4.3.1	Limiar de detecção para os diferentes genes de <i>T.gondii</i>	69
4.3.2	Detecção de DNA de <i>T.gondii</i> em amostras de cérebro e músculos dos ratos experimentalmente infectados.....	69
4.4	Concordância dos resultados do reisolamento em camundongos, sorologia e PCR.....	74
4.5	Genotipagem da cepa BTU-2 de <i>T.gondii</i>	78
5	DISCUSSÃO	79
5.1	Exame sorológico.....	83
5.2	Reisolamento em camundongos.....	88
5.3	Reação em cadeia pela polimerase.....	95
5.4	Tipagem da cepa BTU-2 de <i>T.gondii</i>	108
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
	ANEXOS	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	- porcentagem	ml	- mililitros
χ^2_c	- Qui-quadrado com correção de continuidade	mm	- milímetros
μ l	- microlitros	mmol	- milimol
AIDS	- síndrome da imunodeficiência adquirida (do original em inglês: <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)	NaCl	- cloreto de sódio
bp	- pares de bases (do original em inglês: <i>base pair</i>)	nm	- nanômetros
DNA	- ácido desoxiribonucleico (do original em inglês: <i>desoxiribonucleic acid</i>)	°C	- graus centígrados
DPI	- dia (s) após a inoculação	p	- valor de p
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético	PA	- puro para análise
ELISA	- ensaio imunoenzimático (do original em inglês: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	PCR	- reação em cadeia pela polimerase (do original em inglês: <i>polimerase chain reaction</i>)
fg	- fentograma	pH	- potencial hidrogeniônico
g	- gramas ou força relativa de centrifugação, se relacionado à medida de rotação de centrifugação	pmol	- picomol
G	- grupo	qsp	- quantidade suficiente para
HA	- hemaglutinação passiva	rDNA	- DNA ribossomal
HIV	- vírus da imunodeficiência adquirida (do original em inglês <i>human immunodeficiency virus</i>)	REP	- sequência repetida não codificadora de 529 pares de base
Kb	- kilobases	RIFI	- reação de imunofluorescência indireta
KCl	- cloreto de potássio	SDS	- sódio-duodecil-sulfato
M	- molar	SFT	- solução de formalina tamponada
MAD	- método de aglutinação direta	SPI	- semana (s) após a inoculação
Mb	- megabases	SSA	- solução salina de antibióticos
mg	- miligrama	SST	- solução salina tamponada
mg%	- miligramas por cento	STB	- solução de tampão borato
MgCl ₂	- cloreto de magnésio	taq	- <i>Thermus aquaticus</i>
		TBE	- tampão tris-borato-EDTA
		TE	- tampão TRIS-EDTA, pH 8,5
		TNE	- tampão tris-NaCl-EDTA
		Tris	- tris(hidroximetil)aminometano
		Tris-HCl	- tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto
		U	- unidades

RESUMO

da Silva AV. Avaliação da infecção de ratos Fischer com duas amostras geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii*: cinética de anticorpos, reisolamento em camundongos e reação em cadeia pela polimerase. [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2003.

Com relação ao desenvolvimento do quadro clínico e a transmissão transplacentária, a toxoplasmose em humanos e ratos é similar, e a infecção em ratos pode servir como um modelo para a enfermidade humana. Foram inoculados, pela via oral, sete grupos de ratos com 10^5 (Grupo 1), 10^4 (Grupo 2) e 10^3 (Grupo 3) bradizoítos de *Toxoplasma gondii* cepa BTU-2 (altamente virulenta para camundongos), 10^5 (Grupo 4), 10^4 (Grupo 5) e 10^3 (Grupo 6) bradizoítos de *T.gondii* cepa ME-49 (pouco virulenta para camundongos) e solução salina estéril (Grupo 7 – Controle). Os animais foram observados durante 84 dias, com colheita semanal de sangue para obtenção de soro e realização das provas sorológicas pelos métodos de aglutinação direta (MAD) e imunofluorescência indireta (RIFI) para anticorpos das classes IgG e IgM. Ao final do período os animais foram sacrificados e fragmentos de tecidos colhidos para reisolamento do parasita em camundongos e para detecção de DNA do *T.gondii* pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), utilizando-se oligonucleotídeos dirigidos para a detecção dos genes SAG-1, B1, rDNA e para uma sequência repetida não codificadora (REP). Foi realizada a tipagem da cepa BTU-2 pela avaliação do polimorfismo do gene SAG-2. Todos os ratos desenvolveram títulos de anticorpos detectáveis pelas diferentes técnicas, havendo, independente da cepa inoculada, diferenças mais frequentes entre os grupos que receberam 10^5 e 10^3 bradizoítos. Para IgM a partir do 35º DPI e para a RIFI-IgG e o MAD, a cepa BTU-2 induziu títulos mais elevados que a cepa ME-49. A cepa BTU-2 foi isolada de todas as amostras de cérebro e musculatura estudadas, independente da dose utilizada na infecção dos animais, enquanto que para a cepa ME-49, o parasita foi isolado mais frequentemente do cérebro do que da musculatura, com influência da dose infectante. A PCR-REP foi a mais eficiente na detecção do parasita, principalmente nas amostras de musculatura, detectando DNA de *T.gondii* em 75% das amostras avaliadas. A análise do polimorfismo do gene SAG-2 permitiu classificar a cepa BTU-2 como sendo genótipo III.

ABSTRACT

da Silva AV. Evaluation of Fisher rats infection with two genetically different strains of *Toxoplasma gondii*: kinetics of antibodies, reisolation in mice and polymerase chain reaction. [thesis]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2003.

Referring to the symptoms and transplacental transmission, toxoplasmosis in humans and rats is similar and rats can be used as a model for the disease in humans. 7 groups of rats were inoculated, by oral administration, using 10^5 (Group 1), 10^4 (Group 2) and 10^3 (Group 3) *Toxoplasma gondii* bradyzoites from strain BTU-2, which is highly infective to mice and with 10^5 (Group 4), 10^4 (group 5) and 10^3 (Group 6) *T.gondii* bradyzoites of strain ME-49, which is less infective to mice and, finally, sterile saline solution (Group 7) as a control one. The animals were observed during 84 days, with weekly blood samples, in order to obtain serum and then submitted to serological tests by modified agglutination test (MAT) and immunofluorescent antibody test (IFAT) to antibodies from subtypes IgG and IgM. At the end of time of observation, the animals were killed and samples of their tissues were obtained in order to reisolate the parasite and to detect the *T.gondii* DNA by polymerase chain reaction (PCR), using specific oligonucleotids to detect the genes SAG-1, B1, rDNA and to no coding repetitive sequence (REP). The BTU-2 strain was classified by the SAG-2 gene polymorphism. All the rats developed detectable antibodies titers, no matter which strain was used between the techniques. The most frequent differences in the serological results were among the groups that received 10^5 and those who received 10^3 bradizoits, no matter the strain used. The BTU-2 strain induced higher titles to IgM since 35 DPI and to IFAT-IgG and MAT than the ME-49 strain. The BTU-2 strain also was isolated from all the brain and muscles samples, no matter the dosage used to infect the animals. When the ME-49 strain was used, the parasite was isolated more frequently in the brain than muscles, with influence of the infective dosage. The PCR-REP technique was the most effective to detect the parasite, mainly in muscle samples, detecting the *T.gondii* DNA on 75% of all the studied samples. The BTU-2 strain was classified as type III by the SAG-2 gene polymorphism.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) é classificado no filo Apicomplexa, tendo como parentes próximos na família Sarcocystidae, os parasitas dos gêneros *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Hammondia* e *Neospora*, cujo ciclo de vida é alternado entre um hospedeiro intermediário, definido como o hospedeiro dos estágios assexuados, e um hospedeiro definitivo, que alberga os estágios sexuados. No hospedeiro intermediário, usualmente um herbívoro ou onívoro, ocorre um ou mais ciclos proliferativos em vários tecidos, culminando na formação de cistos teciduais. No hospedeiro definitivo, geralmente um carnívoro, a fase sexual leva à formação de oocistos no intestino. A esporogonia ocorre no hospedeiro definitivo ou fora dele, levando à formação de oocistos do tipo isospora, que contêm dois esporocistos, com quatro esporozoítos cada¹.

O ciclo de vida do *T.gondii* é facultativamente heteroxeno: os felídeos são os hospedeiros definitivos, enquanto que provavelmente todos os animais homeotérmicos são hospedeiros intermediários. A toxoplasmose é uma das zoonoses parasitárias mais comuns, causando também perdas econômicas significativas à pecuária. O homem e os animais podem infectar-se pelas três formas do ciclo de vida do agente: (1) via oral pela ingestão de oocistos eliminados nas fezes de felídeos e

infectantes após esporulação em um a cinco dias, (2) pela ingestão de cistos em tecidos de hospedeiros intermediários, e (3) via uterina pela transmissão transplacentária de taquizoítos. O *T.gondii* também pode ser transmitido em produtos sangüíneos, transplantes de órgãos, ou pela ingestão de taquizoítos, em leite caprino não pasteurizado².

O *T.gondii* possui uma estrutura populacional altamente clonal³, que consiste predominantemente de três linhagens, designadas I, II e III, indicando que sua propagação na natureza ocorra principalmente pela replicação assexuada ou por cruzamentos uniparenterais. A clonalidade foi evidenciada pelos isolamentos de cepas com genótipos idênticos de diferentes hospedeiros provenientes de áreas geográficas distintas. A divergência genômica entre as linhagens é de cerca de 1%⁴. Com relação ao fenótipo de virulência para o camundongo, as diferentes cepas são classificadas em: altamente virulentas, quando um parasita é suficiente para matar o camundongo; pouco virulenta, quando promove infecção crônica em camundongo, sem a necessidade de utilização de tratamento específico; e de virulência intermediária, quando um parasita não é suficiente para matar o camundongo, mas a medicação do animal com altas doses de sulfonamidas é necessária para prevenir a morte⁵.

As cepas de *T.gondii* tipo I ocorrem predominantemente em casos de toxoplasmose humana congênita, enquanto que as cepas do tipo II são prevalentes em pacientes com síndrome da imunodeficiência

adquirida (AIDS)^{3,6}. Contudo, HONORÉ *et al.*⁷ propuseram que as cepas encontradas no homem são na maioria do tipo II e que a prevalência dos genótipos das cepas encontradas em pacientes imunodeprimidos não parece diferir daquela observada nos casos de toxoplasmose congênita. Não está claro se a associação entre as cepas do tipo II com casos de toxoplasmose humana é devido à maior infecciosidade ou maior prevalência deste genótipo^{8,9}.

Segundo o estudo de Howe & Sibley³, a frequência das cepas tipo III é maior em animais do que em casos humanos devendo-se considerar que, em geral, as amostras de *T.gondii* provenientes de humanos causam doença clínica, enquanto que a maioria das amostras provenientes de animais representaram infecções crônicas e subclínicas. Entretanto, Mondragon *et al.*⁹, analisando 43 amostras oriundas de suínos, identificaram 83,7% como sendo do tipo II e 16,3% como tipo III. Owen & Trees¹⁰ identificaram a partir de tecidos naturalmente infectados de 13 fetos ovinos *T.gondii* de genótipo II.

De acordo com Lehmann *et al.*¹¹, as variantes do parasita podem estar melhor adaptadas a diferentes hospedeiros intermediários. Desta forma, torna-se necessária a análise de um maior número de amostras, originárias de múltiplas fontes de infecção, para avaliar as possíveis associações entre genótipos e doença no homem e animais^{9,10}.

A possibilidade de que o genótipo do parasita tenha influência sobre a severidade da doença no homem tem suporte nas diferenças de virulência das cepas em modelos experimentais animais. As cepas do tipo II levam à infecção crônica e produção de cistos teciduais em camundongos, enquanto as cepas do tipo I são extremamente virulentas para camundongos, causando níveis significativos de parasitemia, que pode aumentar o risco de transmissão transplacentária ou severidade de infecção nos fetos em desenvolvimento³.

Na vida pós-natal, os seres humanos infectam-se, na maioria das vezes, pela ingestão de oocistos esporulados encontrados no meio-ambiente ou pela ingestão de cistos em carne crua ou mal cozida de hospedeiros intermediários. Entretanto, não se sabe qual destas vias é epidemiologicamente mais importante, sendo provável que as fontes principais de infecção pelo *T.gondii* sejam diferentes em populações humanas com hábitos culturais e alimentares distintos².

A toxoplasmose humana é na maioria das vezes assintomática. Nos Estados Unidos da América, pela análise dos dados de nove sistemas nacionais de notificação em saúde e dados publicados em periódicos especializados, estimam-se 1.500.000 infecções anuais, sendo cerca de 15% sintomáticas. Neste país, entre 1992 e 1996, a toxoplasmose foi a responsável por cerca de 5.000 hospitalizações, com pelo menos 2.500 casos de origem alimentar, o que representa 4,1% das

internações causadas por infecções alimentares. No período foram registrados 750 óbitos por toxoplasmose, com cerca de 50% de infecções adquiridas pelo consumo de alimentos contaminados, o que representa 20,7% das mortes associadas à infecções de origem alimentar. Além disso, o desenvolvimento de casos crônicos de toxoplasmose, como naqueles indivíduos infectados pela via congênita, nos que desenvolvem corioretinite e em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), é estimado em 4.700 a 12.100 casos anuais¹².

Estimativas atuais indicam que 1/50 da população norte-americana sofre de algum grau de imunodeficiência, o que pode contribuir para uma maior susceptibilidade a doenças oportunistas. Nesta população incluem-se mulheres grávidas, pessoas com mais de 65 anos de idade, pacientes sob tratamento para câncer, transplantados e portadores do HIV. O estado imunodeficiente destes indivíduos pode colocá-los em risco de contrair toxoplasmose ou de reativação de infecções crônicas¹³.

Modelos experimentais de toxoplasmose têm sido desenvolvidos em animais de laboratório para estudar variados aspectos desta enfermidade. Como observado em outras doenças parasitárias, a patologia da infecção pelo *T.gondii* resulta da interação entre fatores parasitários e do hospedeiro. Isto reforça as dificuldades em comparar os dados, algumas vezes discordantes, obtidos por diferentes laboratórios,

uma vez que geralmente os modelos experimentais variam em muitos aspectos: a linhagem do animal, a via de infecção, a cepa de *T.gondii* utilizada, as condições de manutenção e o número de passagens do parasita¹⁴.

Com relação ao desenvolvimento do quadro clínico e a transmissão transplacentária, a toxoplasmose em humanos e ratos é similar e a infecção em ratos pode servir como um modelo para a enfermidade humana, podendo trazer informações importantes quanto à patologia, tratamento e imunoprofilaxia^{13,15}.

Os ratos são considerados um dos hospedeiros mais resistentes ao *T.gondii* em relação à toxoplasmose clínica. Fatores de variação importantes no comportamento do parasita neste modelo experimental são: a cepa utilizada, o estágio infectante e a via de inoculação utilizada¹⁵. Em geral considera-se que a resistência desta espécie ao *T.gondii* está relacionada à idade do animal, sendo que os ratos neonatos seriam susceptíveis e os desmamados resistentes. Entretanto, utilizando a cepa RH de *T.gondii*, inoculada pela via intra-peritoneal, De Champs *et al.*¹⁶ demonstraram diferença significativa na curva de sobrevivência apenas em relação ao número de parasitas inoculados e não em relação à idade, estabelecendo a dose letal como superior a 10^7 parasitas, havendo, entretanto, prejuízo no crescimento no

que se refere ao ganho de peso, dos animais inoculados com doses menores que 10^7 parasitas.

Muitos trabalhos de inoculação de taquizoítos de *T.gondii* em ratos utilizam a cepa RH. Em camundongos esta cepa tem um comportamento sempre fatal, diminuído moderadamente pela quimioprofilaxia. Uma vez que os ratos desenvolvem infecção crônica sem necessidade de terapia, estes têm sido utilizados para manter o parasita¹⁵. Ruchman & Fowler¹⁷ inocularam ratos de 200 a 350g com taquizoítos da cepa RH pela via intraperitoneal, detectando o parasita no sangue desde quatro horas até 16 dias após a inoculação (DPI). Os autores reisolaram o parasita do fígado desde sete DPI até 10 semanas após a inoculação (SPI), do baço de nove DPI até duas SPI, do pulmão de 11 DPI até duas SPI, enquanto que do cérebro reisolaram a partir de quatro dias após a infecção e por período igual a dois anos.

Chinchilla *et al.*¹⁸ reisolaram *T.gondii*, cepa RH, mais freqüentemente de pulmão, baço e fígado, de ratos inoculados pelas vias intraperitoneal e subcutânea com 3×10^7 taquizoítos. Para determinar a cinética da disseminação de *T.gondii*, na fase aguda da infecção, em ratos Fischer de dois meses de idade, Zenner *et al.*¹⁴ inocularam os animais com 10^5 taquizoítos pela via intraperitoneal. Os primeiros órgãos afetados foram baço, diafragma, pulmões, linfonodos mesentéricos e cérebro. No 16º DPI somente o cérebro continha o agente, sendo o

coração, fígado e sangue negativos. Dubey *et al.*¹⁹ inocularam ratos da linhagem Sprague-Dawley com taquizoítos da cepa RH, e mesmo quando recebiam apenas um taquizoíto, os animais desenvolviam anticorpos e o parasita era reisolado em camundongos. Quando inoculados com 10^6 parasitas os animais permaneciam normais, e em oito DPI, a recuperação do parasita de amostras de cérebro nem sempre era possível.

Como outros hospedeiros, os ratos infectam-se também pela ingestão de cistos teciduais²⁰. As infecções induzidas pela ingestão de cistos teciduais são geralmente subclínicas em ratos imunocompetentes¹⁵, e mesmo ratos atímicos sobrevivem a infecções com 100 cistos teciduais²¹.

Henry & Beverley²² inocularam 100 cistos teciduais de *T.gondii*, detectando anticorpos do 16º ao 86º DPI, com título máximo individual de 220 aos 23 DPI. Reisolaram o parasita de um dos 12 baços colhidos aos 23 DPI, e de cinco dos 28 cérebros analisados aos 86 DPI. A cinética da distribuição dos parasitas, após infecção oral de ratos Fischer com cistos de *T.gondii*, cepa Prugnialud, foi investigada por Zenner *et al.*¹⁴, que encontraram parasitas no segundo DPI apenas em linfonodos mesentéricos. No quarto DPI os linfonodos encontravam-se maciçamente parasitados, mais que baço e pulmões, encontrando-se poucos parasitas no fígado e cérebro. O número de parasitas nos tecidos aumentou entre o 4º e 8º DPI, mas declinou rapidamente, com exceção

do cérebro, onde manteve-se alto. Dubey²³ comparou as infecções com bradizoítos das cepas VEG (genótipo III, avirulenta para camundongos) e GT1 (genótipo I, virulenta para camundongos), utilizando diferentes doses, pelas vias subcutânea e oral, em ratos e camundongos. Para ambas as cepas utilizadas todos os ratos permaneceram subclínicos, sendo a infectividade pela via subcutânea (1-10 bradizoítos) comparável para ratos e camundongos, enquanto que pela via oral a infectividade foi menor para os ratos (10-100 bradizoítos para camundongos e 10^3 para ratos). Independentemente da dose, todos os ratos desenvolveram títulos sorológicos entre 3.200-12.800 no teste de aglutinação direta.

Guerrero *et al.*²⁴ inocularam ratos Sprague-Dawley, de um a 15 dias de idade, com 10^4 a 10^7 oocistos de uma cepa avirulenta, pela via oral. Todos soroconverteram e o exame histopatológico do cérebro, para a presença de cistos, revelou que o número de infectados diminuiu com a idade, não sendo verificadas lesões.

Com relação aos oocistos, a dose infectante mínima foi idêntica para camundongos e ratos, entretanto, os ratos desenvolveram infecção subclínica enquanto que os camundongos adoeceram e morreram. Ocasionalmente ratos adultos alimentados com 10^4 - 10^5 oocistos morrem com toxoplasmose aguda, com lesões similares às aquelas vistas em camundongos²⁵.

A distribuição de cistos nos tecidos de ratos alimentados com 1 a 10^5 oocistos das cepas VEG e GT-1 foi estudada por Dubey²⁶. Aos 76 DPI o parasita foi reisolado do cérebro, músculos, pulmões e rins. Aos 240 DPI houve isolamento do parasita de amostras de cérebro, músculos, coração, língua, olhos, pulmões, rins, linfonodos e intestinos, e aos 443 DPI houve isolamento a partir do cérebro, músculos, coração, língua, pulmões, fígado, baço, rins, útero, intestinos e estômago.

Os ratos desenvolvem altos títulos de anticorpos contra *T.gondii*, detectáveis pelo teste de Sabin-Feldman, mas a magnitude da resposta sorológica varia com a cepa e o estágio do agente inoculado. Em ratos inoculados por via intraperitoneal, com mais de 10^4 taquizoítos da cepa RH, foram detectados anticorpos pelo teste de Sabin-Feldman entre o terceiro e o quinto DPI, com título máximo entre 4.000-16.000 aos nove DPI^{27,28}.

Calderón & Thiermann²⁹ demonstraram variações na curva sorológica de ratos inoculados com cepas de *T.gondii* de diferentes virulência para camundongos. A curva sorológica obtida nos animais inoculados com a cepa RH, virulenta para camundongos, iniciou mais precocemente e elevou-se mais rapidamente do que aquela verificada nos ratos inoculados com a cepa ALT, pouco virulenta para camundongos, sendo que a partir dos 56 DPI as curvas se estabilizaram e praticamente se igualaram.

Títulos de anticorpos na reação de hemaglutinação (HA) têm demonstrado serem inconsistentes em ratos, provavelmente variando com a cepa utilizada. Ratos inoculados pela via intraperitoneal, com 10^4 taquizoítos da cepa RH, apresentaram anticorpos na reação de HA em três semanas, mas os inoculados com a mesma dose de taquizoítos da cepa 113-CE não soroconverteram em período inferior a dez semanas²⁷. Zhi-hui *et al.*³⁰ encontraram 62,5% de animais soropositivos já aos oito DPI, e ao final do experimento, aos 64 DPI, sete de nove animais (77,8%) mantinham reação positiva de HA, com pico de detecção de anticorpos dos 40 aos 56 DPI, quando 100% dos animais examinados eram reagentes.

Godard *et al.*³¹ inocularam, pela via oral, ratos Fischer com cistos teciduais da cepa 76K, considerada avirulenta para camundongos, detectando aumento precoce e simultâneo de IgA e IgM, com pico de IgA por volta do 40^o DPI.

Segundo Dubey, ratos adultos desenvolveram anticorpos anti-*T.gondii* após a ingestão de poucos oocistos, detectáveis pelos métodos de aglutinação direta, hemaglutinação e aglutinação ao látex aos 29 DPI, sendo que nos animais infectados os títulos eram maiores que 512 na hemaglutinação e aglutinação ao látex, e maiores que 1.600 e 3.200 na aglutinação direta. Nos ratos não infectados os títulos de hemaglutinação e aglutinação ao látex eram sempre menores que 64 e na

aglutinação direta sempre menores que 25. Neste último teste os títulos tiveram aumento de oito vezes entre o 29^o e o 75^o DPI²⁵.

Em animais experimentalmente infectados a presença de *T.gondii* pode ser estudada também pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). O *T.gondii* possui um genoma nuclear de aproximadamente 87Mb, o que equivale a um conteúdo de DNA de 100×10^{-15} g/parasita³², com 11 cromossomos descritos, um genoma mitocondrial de seis kb e um genoma episomal de 35 kb, na organela denominada apicoplasto⁴. Atualmente as técnicas utilizadas visam, na maioria das vezes, detectar seqüências dos genes SAG-1, que codifica a principal proteína de membrana dos taquizoítos de *T.gondii*, do gene B1, de função desconhecida, ambos presentes no genoma nuclear e porções codificadoras de DNA ribossomal (rDNA). No genoma nuclear do *T.gondii* existe apenas uma cópia do gene SAG-1, 35 cópias do gene B1 e 110 cópias de genes para rDNA, o que em parte explica as diferenças encontradas na sensibilidade de muitos protocolos de PCR para a detecção de *Toxoplasma*³³. Uma nova seqüência, não codificadora, com 200 a 300 cópias no genoma nuclear do *T.gondii*, utilizada na PCR descrita por Homan *et al.*³⁴, demonstrou sensibilidade maior que a detecção do gene B1, possibilitando ainda a quantificação de cistos parasitários no cérebro de animais experimentalmente infectados, usando um ensaio de quantificação competitivo.

Joss *et al.*³⁵ utilizaram um protocolo de *nested*-PCR para a detecção do gene B1 de *T.gondii* em amostras de sangue de ratos infectados pela via intraperitoneal, com as cepas RH e Beverley (genótipo II). Nos animais que receberam a cepa RH, a PCR foi positiva em 11 dos 15 animais testados entre o 16^o e 66^o DPI, corroborando os resultados do reisolamento em camundongos. No entanto, naqueles inoculados com a cepa Beverley, apenas em quatro dos 15 animais foi reisolado o parasita, com a PCR positiva em amostras de 11 animais (entre o 1^o e 38^o DPI).

Zhi-hui *et al.*³⁰ detectaram DNA de *T.gondii*, no sangue periférico de ratos experimentalmente infectados, do primeiro DPI em 10% dos animais até o 64^o DPI, onde oito das nove amostras examinadas (88,9%) foram positivas à PCR para detecção do gene SAG-1.

Em camundongos Swiss, inoculados pela via oral com 20 cistos da cepa C, isolada de placenta humana, Paugam *et al.*³⁶, testaram dois protocolos de PCR para a detecção de parasitemia, um dirigido para o gene B1 e outro para a sequência repetitiva TGR₁E. A PCR-B1 possibilitou a detecção da parasitemia desde 48 horas após a infecção até o sétimo DPI, enquanto que a PCR-TGR₁E detectou os parasitas até o 21^o DPI. O cultivo das amostras de sangue em células MRC5 foi sempre negativo.

Nguyen *et al.*³⁷ inocularam camundongos com 10 cistos da cepa Beverley, pela via intraperitoneal, detectando o parasita em

amostras de cérebro do sexto ao 525^o DPI pela *nested*-PCR para o gene B1, com leitura por prova imunoenzimática (PCR-DEIA), com resultados compatíveis aos da cultura das amostras em células MRC5.

Wastling *et al.*³⁸ demonstraram que um dos fatores limitantes para o sucesso da técnica da PCR é a escolha do oligonucleotídeo utilizado para a inicialização da reação em cadeia. Com amostras de sangue colhidas em diferentes dias após a infecção experimental de ovinos com a cepa S48 de *T.gondii*, os autores verificaram que os oligonucleotídeos dirigidos para identificar o gene SAG-1 proporcionaram duas vezes mais resultados falso-negativos quando comparados com os oligonucleotídeos para o gene B1, sendo que esta PCR detectou os parasitas tão cedo quanto no terceiro DPI, enquanto que a PCR-SAG-1 só detectou os parasitas ao sétimo dia, e o ensaio imunoenzimático aplicado ao soro dos camundongos inoculados com sangue dos ovinos só detectou anticorpos nas amostras obtidas a partir do 11^o DPI.

Outro fator que parece ser importante, principalmente em amostras de tecido, é o número de parasitas utilizado na infecção experimental. Esteban-Redondo & Innes³⁹ inocularam 12 ovelhas com diferentes quantidades de oocistos esporulados de *T.gondii*, sacrificando-as após seis semanas. A seguir ensaiaram a PCR para o gene B1, com detecção por hibridização de sonda específica, em amostras de cérebro,

coração e musculatura esquelética. A detecção do parasita pela PCR foi proporcional ao número de oocistos inoculados. Nos animais que receberam 10^5 oocistos, a PCR foi positiva em 75% dos cérebros e corações, e em 25% das amostras de músculo. Nos animais que receberam 10^4 oocistos, 50% dos cérebros e 25% dos corações foram positivos, enquanto que nas ovelhas inoculadas com 10^3 oocistos, 50% dos cérebros foram positivos à PCR.

Comportamento semelhante foi encontrado por Esteban-Redondo *et al.*⁴⁰ para amostras de ovinos e bovinos infectados pela via oral, com 10^3 ou 10^5 oocistos, e examinados às seis semanas e aos seis meses após a infecção. A PCR-DEIA para o gene B1 revelou a infecção em 100% dos cérebros, 66% dos corações, sendo ausente nos músculos examinados, em ovinos que receberam 10^5 oocistos. Nos ovinos que receberam 10^3 oocistos detectou-se DNA de *T.gondii* em 50% dos corações, enquanto que nenhuma amostra proveniente dos bovinos mostrou-se positiva. Não houve variação quando o exame pela PCR era feito às seis semanas ou aos seis meses após a infecção.

Por outro lado, a escolha da amostra a ser examinada é importante, como demonstra o trabalho de Lin & Su⁴¹, que compararam técnicas para a detecção de anticorpos séricos, antígenos e DNA no diagnóstico de toxoplasmose usando amostras de sangue de gatos, cães e humanos aparentemente saudáveis. A sensibilidade da *nested*-PCR para

o gene B1 foi de 25fg, o correspondente a cerca de $\frac{1}{4}$ de parasita. A detecção de antígenos circulantes e a PCR foram negativas em todas as amostras examinadas.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Neste trabalho, a infecção experimental de ratos com diferentes quantidades de bradizoítos, das cepas BTU-2 e ME-49 de *T.gondii*, pela via oral, teve como objetivos:

1. Avaliar a produção de anticorpos específicos das classes IgM e IgG, pela reação de imunofluorescência indireta e aglutinação direta,
2. Reisolarmos *T.gondii* a partir de amostras de cérebro e músculos, pela inoculação em camundongos,
3. Comparar pares de oligonucleotídeos na detecção de quatro diferentes genes de *T.gondii*, pela reação em cadeia pela polimerase de amostras de cérebro e músculos,
4. Comparar os resultados dos exames sorológicos, reisolamento em camundongos e da reação em cadeia pela polimerase.

Este trabalho também teve como objetivo:

5. Verificar o genótipo da cepa BTU-2 pela análise do polimorfismo do gene SAG-2

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos experimentais foram realizados nos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, SP. Os procedimentos experimentais utilizados nesta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina, UNESP, Campus de Botucatu, SP, como atesta o parecer 112 (Anexo A).

3.1 Delineamento experimental

Numa fase inicial do experimento, cistos teciduais de *T.gondii*, das cepas BTU-2 e ME-49, foram obtidos em ratos e camundongos, respectivamente. Estes cistos foram rompidos com solução ácida de pepsina para a obtenção de bradizoítos livres, que foram inoculados nas concentrações de 10^5 , 10^4 e 10^3 parasitas em grupos de seis ratos Fischer. Estes animais foram observados por período de 84 dias, com colheita semanal de sangue para a detecção de anticorpos séricos das classes IgG e IgM pela reação de imunofluorescência indireta e pela aglutinação direta. Ao final do período de observação, os ratos foram sacrificados e colhidas amostras de cérebro e musculatura. Estas

amostras foram inoculadas após digestão pela pepsina em camundongos, visando o reisolamento do parasita, bem como foram examinadas pela reação em cadeia pela polimerase, utilizando-se diferentes oligonucleotídeos na detecção de DNA do parasita. A cepa BTU-2 foi submetida a análise do polimorfismo do gene SAG-2, visando determinar seu genótipo.

3.2 Animais

Para a produção dos antígenos para as provas sorológicas foram utilizados camundongos Swiss, albinos, de 21 dias de idade, com cerca de 20 a 30 g. Camundongos isogênicos C57Bl/6, de 30 dias de idade foram utilizados para a manutenção da cepa ME-49 de *T.gondii*. Ratos Fischer, de 30 dias de idade, com cerca de 50 a 80g, foram utilizados para inoculação de *T.gondii*, constituindo as unidades experimentais da pesquisa. Esta mesma espécie foi utilizada para a obtenção de cistos teciduais de *T.gondii*. Estes foram obtidos do Biotério Central do Campus de Botucatu, UNESP, a exceção dos camundongos C57Bl/6, cedidos pelo Laboratório de Pesquisa em Doenças Tropicais, Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, Faculdade de Medicina, UNESP, Campus Botucatu.

3.3 Cepas de *T.gondii*

Para a produção dos antígenos utilizados nas provas sorológicas foi utilizada a cepa RH de *T.gondii*, mantida por inoculação intraperitoneal semanal de camundongos Swiss com 0,5 ml de exsudato peritoneal obtido de camundongos previamente infectados.

Para a obtenção dos cistos teciduais de *T.gondii* foi utilizada a cepa BTU-2, isolada de cérebro de cão com sintomatologia neurológica, atendido no ambulatório de Enfermidades Infecciosas dos Animais, do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, SP. Esta amostra apresenta fenótipo de alta virulência para camundongos, sendo mantida por inoculação intraperitoneal semanal de camundongos Swiss com 0,5 ml de exsudato peritoneal obtido de camundongos previamente infectados.

A cepa ME-49, foi gentilmente cedida pelo Prof.Dr. José Roberto Mineo, do Laboratório de Imunologia, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Uberlândia. Trata-se de cepa de genótipo II, de baixa virulência para camundongos, gerando grande quantidade de cistos intracerebrais quando inoculadas nesta espécie. A obtenção de cistos desta cepa é descrita a seguir.

3.4 Obtenção de cistos teciduais

3.4.1 Em ratos

Grupos de quatro ratos foram inoculados com 10^6 taquizoítos de *T.gondii* cepa BTU-2, pela via intraperitoneal. Os animais foram mantidos por até quatro meses após a data da infecção, quando foram sacrificados pela inoculação intraperitoneal de 50 mg/kg de pentobarbital. Os cérebros foram retirados assepticamente, macerados em gral com pistilo e ressuspensos em 1,2 ml de solução salina tamponada de fosfatos, pH 7,2 (SSTF), sendo 25 μ l da suspensão colocadas em lâmina, coberta então com uma lamínula 22x22 mm e o número total de cistos contados. O número de cistos por cérebro foi calculado multiplicando-se a contagem total por 60^{25} .

Após o exame direto, os materiais positivos foram mantidos em solução salina 0,9% por 24 horas a 4°C. Após este período foram homogeneizados com 10 ml de solução salina 0,9%/cérebro, e em seguida com 20 ml de solução isotônica de Percoll a 25%/cérebro e centrifugados a 2.000g/30 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente vertido e o sedimento ressuspensionado em solução salina 0,9%, sendo centrifugado a 1.200g/10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 10 ml de salina 0,9%²³.

3.4.2 Em camundongos

Grupos de 10 camundongos C57Bl/6 foram inoculados com 20 cistos teciduais de *T.gondii*, cepa ME-49, obtidos de camundongos previamente inoculados, pela via oral, com auxílio de agulha de gavage. Os animais foram mantidos por até dois meses após a data da infecção, quando foram sacrificados pela inoculação intraperitoneal de 60 mg/kg de pentobarbital.

Para purificação dos cistos realizou-se a técnica sugerida por MINEO (2001)*. Para tanto, um dia antes do sacrifício dos animais foi preparada solução de dextran a 32,5%, adicionando-se para cada 3,25g de dextran, 10ml de SSTF, deixando em repouso para dissolução. Os cérebros dos animais foram lavados com 5ml de SSTF, para remoção de hemácias aderidas, e para cada cérebro adicionado 2ml de SSTF, homogeneizando-se por repetidas passagens em seringa e agulha, e em seguida transferido para tubo de centrífuga de 50ml; a seringa foi lavada com 2ml de SSTF, adicionando o lavado ao tubo de centrífuga. Para cada cérebro foi adicionado 4ml de dextran a 32,5%, homogeneizando-se por inversão do tubo, e centrifugando-se a 1400g por 22 minutos com a centrífuga na posição *brake off*. O material cerebral foi cuidadosamente retirado da superfície, bem como a suspensão de dextran, exceto os

* MINEO, J.R. (Departamento de Patologia, Universidade Federal de Uberlândia). Comunicação Pessoal, 2001.

0,5ml finais, ressuspensos em 4,5ml de SSTF. Seguiu-se nova centrifugação, a 900g por 10 minutos com a centrífuga na posição *brake on*. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 1ml de SSTF.

Para contagem dos cistos, 8µl da suspensão obtida foi colocada entre lâmina e lamínula, e o número total de cistos contados. O número total de cistos por ml de suspensão foi estabelecido pela fórmula:

$$\text{Nº de cistos} = \frac{\text{Nº de cistos contados em } 8 \mu\text{l}}{16} \times 1000$$

3.4.3 Preparação da suspensão de bradizoítos

Os bradizoítos livres de *T.gondii* foram obtidos conforme o protocolo de Dubey²³, filtrando-se as suspensões de cistos purificados em gaze estéril e incubando-se em solução ácida de pepsina por dez minutos. Os cistos digeridos foram então centrifugados duas vezes, a 1600g por 10 minutos, com descarte do sobrenadante e ressuspensão em solução salina 0,9%, para eliminação da pepsina. Os bradizoítos assim obtidos foram contados em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para inoculação nas unidades experimentais.

3.5 Infecção de ratos

Foram inoculados sete grupos de seis ratos Fischer, fêmeas, de 30 dias de idade, segundo o descrito abaixo:

- Grupo 1 (G1): 10^5 bradizoítos livres de *T.gondii* cepa BTU-2, pela via oral.
- Grupo 2 (G2): 10^4 bradizoítos livres de *T.gondii* cepa BTU-2, pela via oral.
- Grupo 3 (G3): 10^3 bradizoítos livres de *T.gondii* cepa BTU-2, pela via oral.
- Grupo 4 (G4): 10^5 bradizoítos livres de *T.gondii* cepa ME-49, pela via oral.
- Grupo 5 (G5): 10^4 bradizoítos livres de *T.gondii* cepa ME-49, pela via oral.
- Grupo 6 (G6): 10^3 bradizoítos livres de *T.gondii* cepa ME-49, pela via oral.
- Grupo 7 (G7): 100µl de solução salina 0,9%, pela via oral – grupo controle.

Os animais foram mantidos sob observação por período de 84 dias, efetuando-se colheitas semanais de sangue para a obtenção

de soro e ao final do período de observação, sacrificados pela inoculação intraperitoneal de 50 mg/kg de pentobarbital, para colheita dos tecidos a serem analisados.

3.5.1 Colheita de sangue

Amostras de sangue foram colhidas no dia da inoculação, semanalmente durante o período de observação, e no dia do sacrifício dos animais, pela punção do seio orbital. O soro sangüíneo foi obtido por centrifugação das amostras de sangue a 1600 g por 15 minutos, transferido para microtubos identificados e congelados a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

3.5.2 Colheita de tecidos

Após assepsia dos animais com álcool iodado, os cérebros e musculatura (músculos estriados – membro anterior, membro posterior e língua, coração e diafragma constituíram uma só amostra) foram colhidos com tesouras e pinças estéreis, em cabine de biossegurança, e transferidos para béqueres individuais identificados e mantidos sob refrigeração até o processamento para o reisolamento em camundongos e da reação em cadeia pela polimerase. Para avaliar a ocorrência de contaminação entre as amostras, as referentes ao grupo

controle, não infectado, foram colhidas alternando-se a colheita com as amostras dos animais do grupo experimental G1.

3.6 Exame sorológico

3.6.1 Diluição dos soros

As amostras de soro foram diluídas em microplacas de fundo plano, onde foram aplicados 150 µl de SSTF em todas as cavidades. Na primeira cavidade foram adicionados 10 µl de soro e após homogeneização com micropipeta, transferiram-se 50 µl de cada diluição do soro para a cavidade seguinte, obtendo-se diluições na razão quatro. Os soros foram examinados tanto pela prova de imunofluorescência indireta quanto pela aglutinação direta pelo menos até a diluição 1:16.384, ou até a extinção do título.

3.6.2 Reação de imunofluorescência indireta

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi realizada segundo o protocolo de Camargo⁴². O detalhamento da produção de antígeno para a RIFI é apresentado no anexo C.

Cada diluição do soro foi distribuída em volume de 20 µl em cada célula da lâmina previamente preparada e incubada a 37°C por

30 minutos em câmara úmida. Estas foram lavadas duas vezes por imersão em SSTF por 10 minutos, e a seguir, secas em estufa a 37°C. As células das lâminas foram recobertas com 20 µl de conjugado anti-IgG ou anti-IgM específicos, em reações separadas, diluído segundo seu título em azul de Evans a 4 mg%, e incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Posteriormente as lâminas foram novamente lavadas duas vezes por imersão em SSTF por 10 minutos, sendo secas em estufa a 37°C e montadas com glicerina tamponada pH 8,5 e lamínula 24x60 mm. Foram examinadas em microscópio de fluorescência sob aumento de 500x. O título foi determinado como aquela diluição do soro em que se evidenciou fluorescência em toda a periferia dos taquizoítos. A ausência de fluorescência ou a fluorescência apenas na extremidade dos parasitas (fluorescência polar) foram consideradas como reações negativas.

3.6.3 Método de aglutinação direta

O método de aglutinação direta (MAD) foi realizado segundo Desmonts & Remington⁴³. O detalhamento da produção de antígeno para esta prova é apresentado no anexo C.

Com pipeta de múltiplo-canal, 50 µl de cada diluição dos soros foram transferidos para microplacas com fundo em V. Em seguida, adicionaram-se 25 µl de 2-mercaptoetanol 0,2 M em solução salina tamponada e 50 µl do antígeno diluído. As placas foram seladas com

filme plástico, homogeneizadas por um minuto e incubadas a temperatura ambiente, por seis horas, procedendo-se então a leitura.

Como reações positivas consideraram-se aqueles soros em que houve aglutinação do antígeno, caracterizado pela formação de uma película, tomando pelo menos 50% da área da cavidade da microplaca. A formação de botão compacto ou ocupando menos de 50% da área da cavidade da microplaca foram consideradas como reações negativas. Em todas as placas foram testados soros controles sabidamente positivos e negativos, os quais orientaram a interpretação de cada reação.

3.7 Reisolamento em camundongos

A metade de cada uma das amostras de cérebro e parte da musculatura colhidas foram inoculadas em camundongos Swiss, para tentativa de reisolamento de *T.gondii*. Foi realizada a digestão prévia das amostras em solução ácida de pepsina de acordo com Dubey⁴⁴.

Para tanto, os tecidos foram pesados, triturados em gral com pistilo e ressuspensos em solução de antibióticos em proporção de 1:5, onde foram mantidos a temperatura ambiente por três horas. A suspensão foi então transferida para béquer e aquecida a 37°C, adicionando-se então igual volume de solução ácida de pepsina pré-aquecida a 37°C. Este material foi incubado sob agitação constante por

60 minutos a 37°C. A seguir foi filtrado em gaze estéril e centrifugado a 1200g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, homogeneizando-se o sedimento em 20 ml de SSTF. Adicionou-se então 10 ml de solução de bicarbonato de sódio 6%, centrifugando-se a suspensão a 1200g por dez minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 5 ml de solução de antibióticos. Foram inoculados quatro camundongos por amostra digerida, e observados por período de no máximo 60 dias. Dos animais que morreram durante o período de observação foram examinados o líquido peritoneal na busca de taquizoítos de *T.gondii*, e decalques de fragmentos de baço, fígado, pulmão e cérebro, corados pelo método de Giemsa⁴⁵. Dos animais que sobreviveram ao período de observação, foi colhido o sangue pela punção do seio retro-orbital, e após separação do soro, realizada a RIFI para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* utilizando conjugado anti-IgG murina, conforme descrito no item 3.6.2. Foram consideradas positivas aquelas amostras em que foram observadas formas parasitárias, no líquido peritoneal ou nos órgãos, ou naqueles animais em que a RIFI foi positiva⁴⁶.

3.8 Reação em cadeia pela polimerase

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de ácido desoxirribonucléico (DNA) de *T.gondii* foi realizada segundo o protocolo de Da Silva & Langoni⁴⁷. Foram comparados quatro pares de

oligonucleotídeos, dirigidos para amplificação de seqüências dos genes SAG-1, B1, codificadoras de DNA ribossômico (rDNA) e uma seqüência repetida não codificadora de 529 pares de base (REP).

Medidas para evitar a contaminação entre amostras foram utilizadas em todas as fases do protocolo experimental, desde a colheita das mesmas, pela utilização de materiais individuais e estéreis, bem como para as etapas características da PCR, seguindo as recomendações de Kwok⁴⁸, tais como utilização de salas diferentes para a extração de DNA, preparação de reagentes, amplificação e análise das amostras, troca frequente de luvas, material plástico individual e descartável, e utilização de controles dos reagentes de extração e amplificação.

3.8.1 Determinação do limiar de detecção

Para a determinação do limiar de detecção da PCR para cada um dos genes de *T.gondii*, uma suspensão de 10^5 taquizoítos por ml de *T.gondii*, contados em câmara de NewBauer, foi diluída em 225 µl de uma suspensão de cérebro de rato a 20% em tampão TRIS-EDTA pH 8,5, a fim de se obter diluições sucessivas de 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 parasitas por ml de suspensão de cérebro. O DNA destas amostras foi extraído conforme descrito no item 3.8.2, e a PCR realizada segundo o item 3.8.3 desta seção.

3.8.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA foram utilizadas metade de cada uma das amostras de cérebro e de musculatura colhidas. Assim as amostras foram maceradas em gral com pistilo e diluídas em tampão Tris-EDTA, na proporção 1:5. Do macerado, após ciclo de congelamento a -20°C seguido de descongelamento a 37°C em banho-maria, 250 μl de cada amostra foram homogeneizados vigorosamente em vórtex com 250 μl de solução tampão de extração, composta de 200 mmol de cloreto de sódio, 20 mmol de Tris pH 8, 50 mmol de EDTA pH 8,0, 1mg/ml de proteinase K e 2% de sódio-dodecil-sulfato (SDS), em microtubo de 1,5 ml. Em seguida os microtubos foram incubados a 56°C por uma hora. Adicionaram-se então 500 μl de fenol, homogeneizando-se vigorosamente em vórtex, centrifugando-se a 13200 g por três minutos. A seguir, 300 μl da fase aquosa foram cuidadosamente transferidos para novo microtubo de 1,5 ml. Adicionaram-se 150 μl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizando-se vigorosamente em vórtex, seguindo-se centrifugação a 13200 g por três minutos. Foram transferidos 200 μl da fase aquosa para novo microtubo de 1,5 ml, adicionando-se então 36 μl de acetato de sódio 2 M e 472 μl de etanol absoluto gelado, mantendo-se os microtubos a -20°C por pelo menos 12 horas. As amostras foram então centrifugadas a 13200 g por dez minutos, vertendo-se o etanol cuidadosamente, adicionando-se 470 μl de etanol 70%. Após

homogeneização cuidadosa, os microtubos foram centrifugados como anteriormente, retirando-se em seguida o etanol, secando-se os microtubos a temperatura ambiente. As amostras foram ressuspendidas em 50 µl de água ultra-pura.

3.8.3 Reação em cadeia pela polimerase

Cada tubo de reação de 0,2 ml recebeu 5 µl de tampão de PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl), 1,5 µl de $MgCl_2$ (1,5 mM), 8,0 µl da solução de deoxinucleotídeos (1,25 mM), 1,5 U de taq-polimerase, 40 pM de cada oligonucleotídeo, 10 µl de amostra e 15,2 µl de água ultra-pura. Foram utilizados, em reações separadas, os pares de oligonucleotídeos descritos no Quadro 1, sob condições de reação apresentadas no mesmo quadro, a seguir.

QUADRO 1. Oligonucleotídeos e condições dos ciclos nas reações de PCR para a detecção dos genes SAG-1, B1, DNA ribossômico (rDNA) e da sequência repetida de 529pb (REP) de *T.gondii*.

Etapa	SAG-1*	B1**
Oligonucleotídeo 1	5'CGACAGCCGCGGTCATTCTC	5'GCCTCTCTCTTCAAGCAGCGTA
Oligonucleotídeo 2	5'GCAACCAGTCAGCGTCGTCC	5'TCGGAGAGAGAAGTTCGTGCGAT
Denaturação inicial	95°C/5 min.	95°C/5 min.
Denaturação	95°C/1 min	95°C/45 seg.
Pareamento	60°C/1 min.	55°C/1 min.
Extensão	74°C/3 min.	72°C/1,5 min.
Incubação	25°C/5 min.	72°C/10 min.
Nº de ciclos	30	35
Tamanho do fragmento	522 pb	300 pb
Etapa	rDNA***	REP****
Oligonucleotídeo 1	5'GGTCGCGTTGACTTCGGTCT)	5'CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG
Oligonucleotídeo 2	5'TCAGTCCTAGAAACCAACAAA	5'CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT
Denaturação inicial	93°C/5 min.	94°C/7 min.
Denaturação	93°C/2 min.	94°C/1 min.
Pareamento	57°C/2 min.	60°C/1 min.
Extensão	72°C/2 min.	72°C/1 min.
Incubação	072°C/5 min.	72°C/10 min.
Nº de ciclos	35	35
Tamanho do fragmento	586 pb	529 pb

*Savva et al.⁴⁹; **Burg et al.⁵⁰; ***Tenter et al.⁵¹; ****Homan et al.³⁴

3.8.4 Eletroforese em gel de agarose para identificação dos produtos amplificados

Alíquotas de 10 μ l das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 5 μ l de solução de azul de bromofenol e submetidas a eletroforese horizontal em gel de agarose 3% em tampão tris-borato-EDTA 0,5x. A corrida foi realizada a 100 voltz por 90 minutos. Após a corrida o gel foi corado em solução de brometo de etídeo por uma hora, e a visualização das bandas realizada em transiluminador ultravioleta, com filtro de 300 nm. Os géis foram fotografados utilizando-se sistema fotográfico Polaroid.

3.9 Genotipagem da cepa BTU-2 de *T.gondii*

Visando determinar o genótipo da cepa BTU-2, utilizada na infecção dos grupos G1, G2 e G3, analisou-se o polimorfismo do gene SAG-2, que codifica a proteína de membrana de taquizoítos denominada P22⁵².

O polimorfismo do gene SAG-2 foi verificado segundo Honoré *et al.*⁷, onde os produtos de amplificação de duas *nested*-PCRs, uma para a extremidade 5' do gene e outra para a extremidade 3', foram digeridos pelas enzimas de restrição *Sau3AI* e *HhaI*, respectivamente, possibilitando a obtenção de perfis eletroforéticos que permitem a diferenciação dos três genótipos de *T.gondii* (Figura 1).

A extração do DNA para a genotipagem foi efetuada a partir de amostras de líquido peritoneal de camundongos previamente infectados com as cepas estudadas, segundo o protocolo descrito no item 3.8.2, seguindo-se a *nested*-PCR das amostras com os mesmos componentes de reação apresentadas no item 3.8.3, com a diferença que na segunda PCR foi utilizada 1,0µl do produto amplificado na reação anterior. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: denaturação inicial de 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de denaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 65°C (região 5') ou 63°C (região 3') por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 5

minutos. Para a amplificação da região 5' foram utilizados os oligonucleotídeos F4 (5'-GCTACCTCGAACAGGAACAC-3') e R4 (5'-GCATCAACAGTCTTCGTTGC-3'), seguido de nova PCR com os oligonucleotídeos F (5'-GAAATGTTTCAGGTTGCTGC-3') e R2 (5'-GCAAGAGCGAACTTGAACAC-3'). Para a amplificação da região 3' foram utilizados os oligonucleotídeos F3 (5'-TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC-3') e R3 (5'-TCAAAGCGTGCATTATCGC-3'), seguido de nova PCR com os oligonucleotídeos F2 (5'-ATTCTCATGCCTCCGCTTC-3') e R (5'-AACGTTTCACGAAGGCACAC-3'). Como controle das reações utilizaram-se as cepas RH (genótipo I), ME-49 (genótipo II) e M7741 (genótipo III), sendo esta última gentilmente cedida pelo Prof.Dr. Alvaro Freyre, do Laboratorio de Toxoplasmosis, Departamento de Parasitologia Veterinaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguai.

Após a obtenção dos produtos finais de reação, 7 µl dos mesmos foram digeridos com 3 µl de mistura de digestão contendo uma unidade da enzima de restrição *Sau3AI* ou *HhaI*, incubando-se por duas horas a 37°C. Após a digestão enzimática das amostras foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1,5%, conforme o descrito no item 3.8.4.

Os genótipos foram diferenciados pela comparação entre a corrida eletroforética do material amplificado, e do material amplificado

incubado com as enzimas *HhaI* ou *Sau3AI*. Para as cepas genótipo I foi evidenciada apenas uma banda de 220 pares de base na amplificação da extremidade 3' e uma banda de 245 pares de base na amplificação da extremidade 5', sem ação das enzimas sobre o fragmento amplificado. Para as cepas genótipo II foi evidenciada a formação de uma banda de 175 pares de base quando o material amplificado com a PCR para a extremidade 3' foi submetido à digestão pela enzima *HhaI*, enquanto que para as cepas genótipo III a diferenciação foi possível pela formação de uma banda de 200 pares de base após a digestão do produto da PCR para a extremidade 5' pela enzima *Sau3AI*.

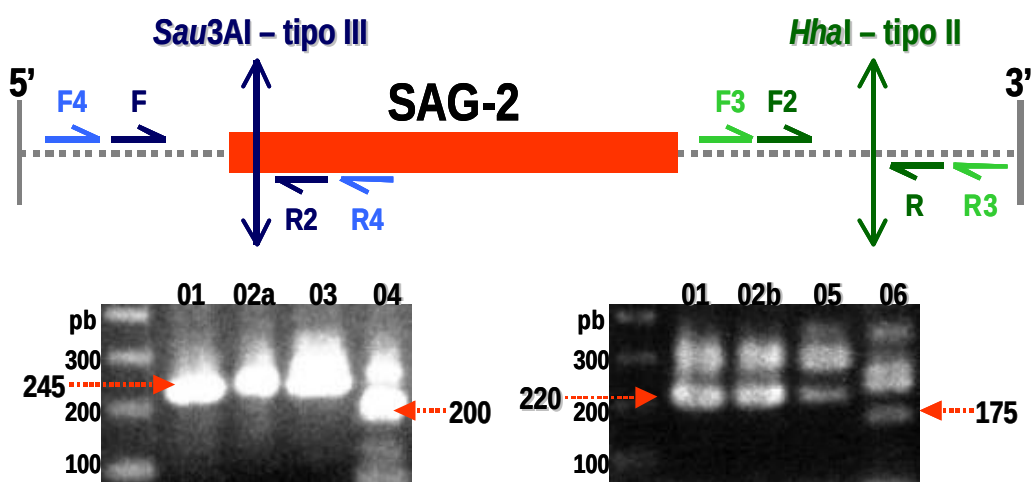


FIGURA 1. Princípio da genotipagem de amostras de *T.gondii* pela amplificação do gene SAG2 seguida de corte dos produtos amplificados por enzimas de restrição.

Uma *nested-PCR* é realizada em cada extremidade do gene. Estas regiões possuem sítios de polimorfismo que permitem, na extremidade 5', diferenciar as cepas tipo III pelo corte com a enzima *Sau3A*, e na extremidade 3', diferenciar as cepas tipo II pelo corte com a enzima *HhaI*. As cepas tipo I não sofrem a ação das enzimas (adaptado de Honoré *et al.*⁷). pb=pares de base; 01) cepa RH; 02a) cepa RH após incubação com a enzima *Sau3AI*; 02b) cepa RH após incubação com a enzima *HhaI*; 03) cepa M7741; 04) cepa M-7741 após incubação com a enzima *Sau3AI*; 05) cepa ME-49; 06) cepa ME-49 após incubação com a enzima *HhaI*.

3.10 Análise estatística

Os resultados das provas sorológicas foram expressos em mediana dos valores dos títulos das seis unidades experimentais de cada grupo e foram comparados entre os grupos G1, G2 e G3, e entre os grupos G4, G5 e G6, segundo o momento de colheita de amostras, pela prova não-paramétrica de Kruskal-Wallis*, para verificar a influência do número de parasitas inoculados no comportamento da curva sorológica pelos diferentes métodos utilizados. Para verificar o efeito da cepa de *T.gondii* utilizada sobre a curva sorológica, os pares de grupos inoculados com a mesma dose de parasitas, ou seja, G1 x G4, G2 x G5 e G3 x G6, foram comparados, para cada momento de colheita de amostras, pela prova não-paramétrica de Mann-Whitney*. Graficamente, as médias dos dados foram apresentadas após a transformação logarítmica dos títulos individuais observados⁵³.

A concordância dos resultados dos exames sorológicos e das PCRs, em comparação com o resultado do reisolamento em camundongos para amostras de cérebro e músculo, foi verificada pelo método de McNemar, calculando-se o índice de associação kappa, independente da dose, para cada uma das cepas inoculadas, utilizando-

* Análises realizadas utilizando-se o programa GraphPad Instat v.3 (GraphPad Software, Inc., 1997).

se a planilha descrita por Mackinnon⁵⁴. Os resultados das PCRs, independente das cepas de *Toxoplasma* inoculadas e dos tecidos analisados, foram comparadas pela prova Q de Cochran*, e as diferenças individuais apontadas pelo método de McNemar⁵⁴.

Para todas as análises foi considerado o nível de significância $\alpha=0,05$ ⁵³.

* Análise realizada utilizando-se o programa Statistica v.4.3 (Stat Soft, Inc., 1993).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Exame sorológico

Os resultados do exame sorológico pela RIFI para IgG e IgM e pelo MAD são apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3 indicando a mediana dos títulos de cada grupo experimental nos diferentes momentos de colheita das amostras. O pico de anticorpos em cada uma das curvas é assinalado por um asterisco. Os títulos individuais são apresentados nas Tabelas 9 a 14, no Anexo D. As Figuras 2 a 4 resumem graficamente os mesmos dados, indicando a média do log dos títulos de cada grupo experimental nos diferentes momentos de colheita das amostras. Todos os resultados dos animais do Grupo 7, independente da imunoglobulina pesquisada ou método utilizado, foram negativos.

Para os animais infectados com a cepa BTU-2 de *T.gondii*, anticorpos da classe IgM foram detectados a partir dos sete DPI em todos os grupos, mas mais frequentemente nos animais do grupo G1, e aos 21 DPI todos os animais, independente da dose infectante recebida, eram soropositivos para a RIFI-IgM. O pico de anticorpos IgM, considerando os valores medianos, se deu aos 28 DPI para G1 e G2, e aos 49 DPI para G3. Os valores medianos de RIFI-IgM foram iguais até os 14 DPI, bem como aos 42, 56 e 84 DPI, sendo que nos outros períodos

normalmente não houve diferença entre G1 e G2, e entre G2 e G3, mas os valores medianos de G3 foram mais elevados do que em G1 (Figura 2A)

Nos animais infectados com a cepa ME-49, a RIFI-IgM foi positiva a partir dos sete DPI, com pico de anticorpos aos 35 DPI para G4 e aos 21 DPI para G5 e G6. A curva de RIFI-IgM em geral teve comportamento similar entre G4, G5 e G6, sendo apontadas diferenças apenas aos 42, 49 e 63 DPI, quando os valores de G4 não diferiram de G5, mas foram mais elevados que em G6 (Figura 2B)

Anticorpos IgG foram detectados pela RIFI nos grupos G1, G2 e G3 a partir dos 14 DPI, com pico aos 56 DPI para G2 e aos 63 DPI para G1 e G3. A mediana dos resultados da RIFI-IgG, nos animais inoculados com *T.gondii* cepa BTU-2, não diferiu nos 7, 56, 77 e 84 DPI, mas os valores de G1 foram mais elevados que os de G3 dos 14 aos 49 e aos 70 DPI, não havendo diferença entre G1 e G2, e entre G2 e G3 neste mesmo período. Aos 63 e 70 DPI os valores medianos de IgG foram maiores em G1 comparados aos resultados de G2 (Figura 3A)

Para a cepa ME-49, os resultados da RIFI-IgG foram iguais entre os grupos até os 42 DPI, sendo detectados anticorpos a partir dos sete DPI em um animal do grupo G6 e a partir dos 14 DPI nos demais grupos, com pico de anticorpos aos 35 DPI para G4 e G5 e aos 28 DPI para G6. A partir do 49 DPI a mediana de G4 sempre foi superior a de

G6, não diferindo de G5 em nenhum momento. Neste período as medianas de G5 foram iguais as de G6 aos 63, 77 e 84 DPI, diferindo aos 49, 56 e 70 DPI (Figura 3B).

O método de aglutinação direta não acusou diferenças nos títulos medianos entre os grupos G1 e G2, inoculados com a cepa BTU-2, em nenhum dos momentos de colheita de amostras. Os valores medianos de G1 foram mais elevados que os de G3 aos 14, 35, 63 e 70 DPI, não diferindo nos outros momentos. G2 diferiu de G3 aos 14, 28 e 35 DPI. Os anticorpos foram detectados a partir de 14 DPI, com pico aos 42 DPI para G2 e aos 63 DPI para G1 e G3 (Figura 4A).

Nos animais inoculados com a cepa ME-49, o comportamento do MAD foi igual entre os três grupos experimentais até os 35 DPI e aos 49 DPI, não havendo diferença entre G4 e G5 em nenhum outro momento do estudo. As medianas de G4 pela MAD foram superiores às de G6 aos 42, 63, 77 e 84 DPI, e G5 diferiu de G6 apenas no período de 56 a 70 DPI. Os anticorpos foram detectados a partir de 14 DPI, com pico aos 42 DPI para G5 e aos 35 DPI para G4 e G6 (Figura 4B).

Comparando-se as curvas sorológicas obtidas nos animais inoculados com as cepas BTU-2 e ME-49, denota-se que o título de IgM não diferiu de um grupo para o outro nos primeiros 14, 21 e 35 DPI, para os animais inoculados com 10^5 , 10^4 e 10^3 bradizoítos,

respectivamente, sendo sempre mais elevado para a cepa BTU-2, aos 21 e 28 DPI, a partir de 28, e aos 42 DPI, para os animais inoculados com 10^5 , 10^4 e 10^3 bradizoítos, respectivamente. Nos animais inoculados com 10^5 parasitas não houve diferença na IgM após 35 DPI. Para a RIF-IgG e o MAD, os resultados não diferiram entre as cepas inoculadas entre 0 a 14 e aos 35 DPI, sendo a partir de então sempre mais elevados nos grupos infectados com a cepa BTU-2, exceto nos grupos que receberam 10^3 bradizoítos, onde no 14 DPI, o título mediano era menor entre os animais inoculados com a cepa BTU-2.

TABELA 1. Resultado (mediana) dos títulos ao exame sorológico pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgM, anti-*T.gondii*, em soros de ratos experimentalmente infectados com 10^5 (Grupo 1 – G1), 10^4 (Grupo 2 – G2) e 10^3 bradizoítos (Grupo 3 – G3) de *T.gondii* cepa BTU-2, e 10^5 (Grupo 4 – G4), 10^4 (Grupo 5 – G5) e 10^3 bradizoítos (Grupo 6 – G6) de *T.gondii* cepa ME-49. Botucatu, 2002.

DPI#	G1	G2	G3	G4	G5	G6
0	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}
7	8 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}
14	16 ^{Aa}	16 ^{Aa}	8 ^{Aa}	8 ^{Aa}	16 ^{Aa}	16 ^{Aa}
21	64 ^{Aa}	64 ^{ABa}	16 ^{Ba}	16 ^{Ab}	64 ^{*Aa}	64 ^{*Aa}
28	256 ^{*Aa}	256 ^{*Aa}	64 ^{Ba}	64 ^{Ab}	64 ^{Ab}	64 ^{Aa}
35	256 ^{ABa}	256 ^{Aa}	64 ^{Ba}	160 ^{*Aa}	64 ^{Ab}	64 ^{Aa}
42	64 ^{Aa}	256 ^{Aa}	256 ^{Aa}	160 ^{Aa}	64 ^{ABb}	64 ^{Bb}
49	64 ^{Aa}	64 ^{ABa}	1024 ^{*Ba}	64 ^{Aa}	16 ^{ABb}	16 ^{Bb}
56	64 ^{Aa}	64 ^{Aa}	160 ^{Aa}	16 ^{Aa}	16 ^{Ab}	16 ^{Ab}
63	16 ^{Aa}	64 ^{ABa}	160 ^{Ba}	16 ^{Aa}	16 ^{ABb}	0 ^{Bb}
70	16 ^{Aa}	40 ^{ABa}	160 ^{Ba}	8 ^{Aa}	0 ^{Ab}	0 ^{Ab}
77	0 ^{Aa}	16 ^{ABa}	64 ^{Ba}	0 ^{Aa}	0 ^{Ab}	0 ^{Ab}
84	0 ^{Aa}	16 ^{Aa}	40 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Ab}	0 ^{Ab}

DPI = dias após a inoculação; * pico de anticorpos; ESTATÍSTICA: Para G1 x G2 x G3 e para G4 x G5 x G6, segundo os momentos de colheitas de amostras, letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas pela prova de Kruskal-Wallis, com $\alpha=0,05$; Para os pares G1 x G4, G2 x G5 e G3 x G6, segundo os momentos de colheitas de amostras, letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas pela prova de Mann-Whitney, com $\alpha=0,05$.

TABELA 2. Resultado (mediana) dos títulos ao exame sorológico pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG, anti-*T.gondii*, em soros de ratos experimentalmente infectados com 10^5 (Grupo 1 – G1), 10^4 (Grupo 2 – G2) e 10^3 bradizoítos (Grupo 3 – G3) de *T.gondii* cepa BTU-2, e 10^5 (Grupo 4 – G4), 10^4 (Grupo 5 – G5) e 10^3 bradizoítos (Grupo 6 – G6) de *T.gondii* cepa ME-49. Botucatu, 2002.

DPI#	G1	G2	G3	G4	G5	G6
0	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}
7	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}
14	64 ^{Aa}	16 ^{ABa}	0 ^{Ba}	16 ^{Aa}	8 ^{Aa}	8 ^{Aa}
21	256 ^{Aa}	64 ^{ABa}	0 ^{Ba}	64 ^{Ab}	16 ^{Aa}	40 ^{Aa}
28	640 ^{Aa}	256 ^{ABa}	160 ^{Ba}	64 ^{Ab}	40 ^{Ab}	64 ^{*Aa}
35	1024 ^{Aa}	640 ^{ABa}	256 ^{Ba}	256 ^{*Ab}	64 ^{*Ab}	64 ^{Aa}
42	1024 ^{Aa}	1024 ^{ABa}	640 ^{Ba}	160 ^{Ab}	64 ^{Ab}	40 ^{Ab}
49	4096 ^{Aa}	2560 ^{ABa}	1024 ^{Ba}	64 ^{Ab}	64 ^{Ab}	40 ^{Bb}
56	4096 ^{Aa}	4096 ^{*Aa}	1024 ^{Aa}	64 ^{Ab}	40 ^{Ab}	40 ^{Bb}
63	10240 ^{*Aa}	1024 ^{Ba}	4096 ^{*ABa}	64 ^{Ab}	40 ^{ABb}	16 ^{Bb}
70	4096 ^{Aa}	256 ^{Ba}	256 ^{Ba}	64 ^{Ab}	40 ^{Ab}	16 ^{Bb}
77	2560 ^{Aa}	256 ^{Aa}	256 ^{Aa}	64 ^{Ab}	16 ^{ABb}	16 ^{Bb}
84	1024 ^{Aa}	256 ^{Aa}	256 ^{Aa}	40 ^{Ab}	16 ^{ABb}	16 ^{Bb}

DPI = dias após a inoculação; * = pico de anticorpos; ESTATÍSTICA: Para G1 x G2 x G3 e para G4 x G5 x G6, segundo os momentos de colheitas de amostras, letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas pela prova de Kruskal-Wallis, com $\alpha=0,05$; Para os pares G1 x G4, G2 x G5 e G3 x G6, segundo os momentos de colheitas de amostras, letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas pela prova de Mann-Whitney, com $\alpha=0,05$.

TABELA 3. Resultado (mediana) dos títulos ao exame sorológico método de aglutinação direta (MAD) para detecção de anticorpos anti-*T.gondii*, em soros de ratos experimentalmente infectados com 10^5 (Grupo 1 – G1), 10^4 (Grupo 2 – G2) e 10^3 bradizoítos (Grupo 3 – G3) de *T.gondii* cepa BTU-2, e 10^5 (Grupo 4 – G4), 10^4 (Grupo 5 – G5) e 10^3 bradizoítos (Grupo 6 – G6) de *T.gondii* cepa ME-49. Botucatu, 2002.

DPI#	G1	G2	G3	G4	G5	G6
0	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}
7	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}
14	40 ^{Aa}	16 ^{Aa}	0 ^{Ba}	16 ^{Aa}	16 ^{Aa}	16 ^{Ab}
21	256 ^{Aa}	256 ^{Aa}	16 ^{Aa}	64 ^{Aa}	40 ^{Aa}	64 ^{Aa}
28	640 ^{ABa}	1024 ^{Aa}	160 ^{Ba}	64 ^{Aa}	64 ^{Ab}	64 ^{Aa}
35	1024 ^{Aa}	1024 ^{Aa}	256 ^{Ba}	256 ^{*Ab}	160 ^{Ab}	256 ^{*Aa}
42	1024 ^{Aa}	4096 ^{*Aa}	1024 ^{Aa}	256 ^{Ab}	256 ^{*ABb}	64 ^{Bb}
49	4096 ^{Aa}	4096 ^{Aa}	2560 ^{Aa}	64 ^{Ab}	64 ^{Ab}	64 ^{Ab}
56	4096 ^{Aa}	4096 ^{Aa}	2560 ^{Aa}	64 ^{ABb}	64 ^{Ab}	40 ^{Bb}
63	10240 ^{*Aa}	4096 ^{ABa}	4096 ^{*Ba}	64 ^{Ab}	64 ^{Ab}	16 ^{Bb}
70	4096 ^{Aa}	4096 ^{ABa}	1024 ^{Ba}	64 ^{ABb}	64 ^{Ab}	16 ^{Bb}
77	2560 ^{Aa}	1024 ^{Aa}	4096 ^{Aa}	40 ^{Ab}	16 ^{ABb}	16 ^{Bb}
84	1024 ^{Aa}	1024 ^{Aa}	1024 ^{Aa}	40 ^{Ab}	16 ^{ABb}	16 ^{Bb}

DPI = dias após a inoculação; * = pico de anticorpos; ESTATÍSTICA: Para G1 x G2 x G3 e para G4 x G5 x G6, segundo os momentos de colheitas de amostras, letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas pela prova de Kruskal-Wallis, com $\alpha=0,05$; Para os pares G1 x G4, G2 x G5 e G3 x G6, segundo os momentos de colheitas de amostras, letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas pela prova de Mann-Whitney, com $\alpha=0,05$.

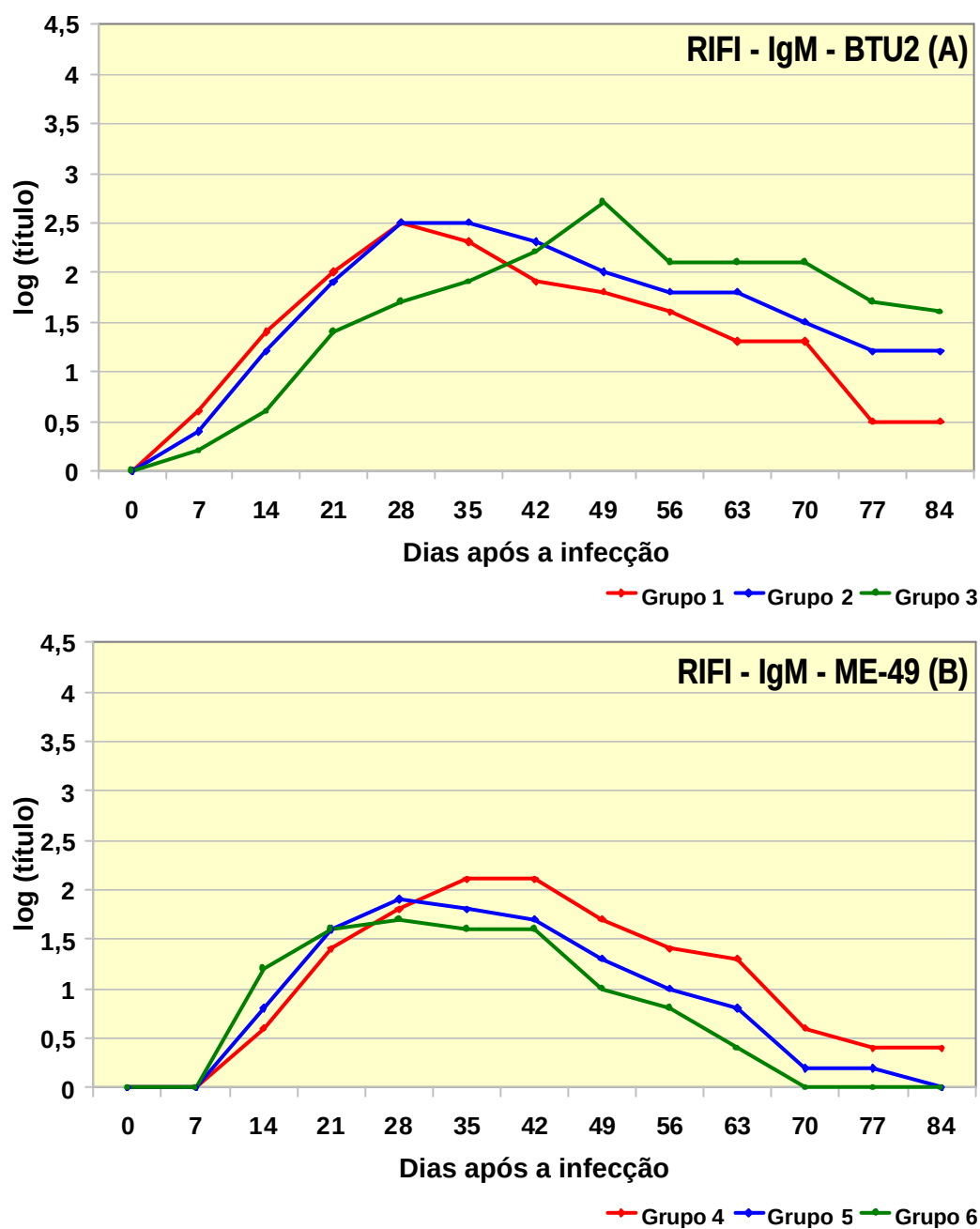


FIGURA 2. Média dos log dos títulos ao exame sorológico pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgM, anti-*T.gondii*, em soros de ratos experimentalmente infectados com 10^5 (Grupo 1), 10^4 (Grupo 2) e 10^3 bradizoítos (Grupo 3) de *T.gondii* cepa BTU-2 (A), e infectados com 10^5 (Grupo 4), 10^4 (Grupo 5) e 10^3 bradizoítos (Grupo 6) de *T.gondii* cepa ME-49 (B). Botucatu, 2002.

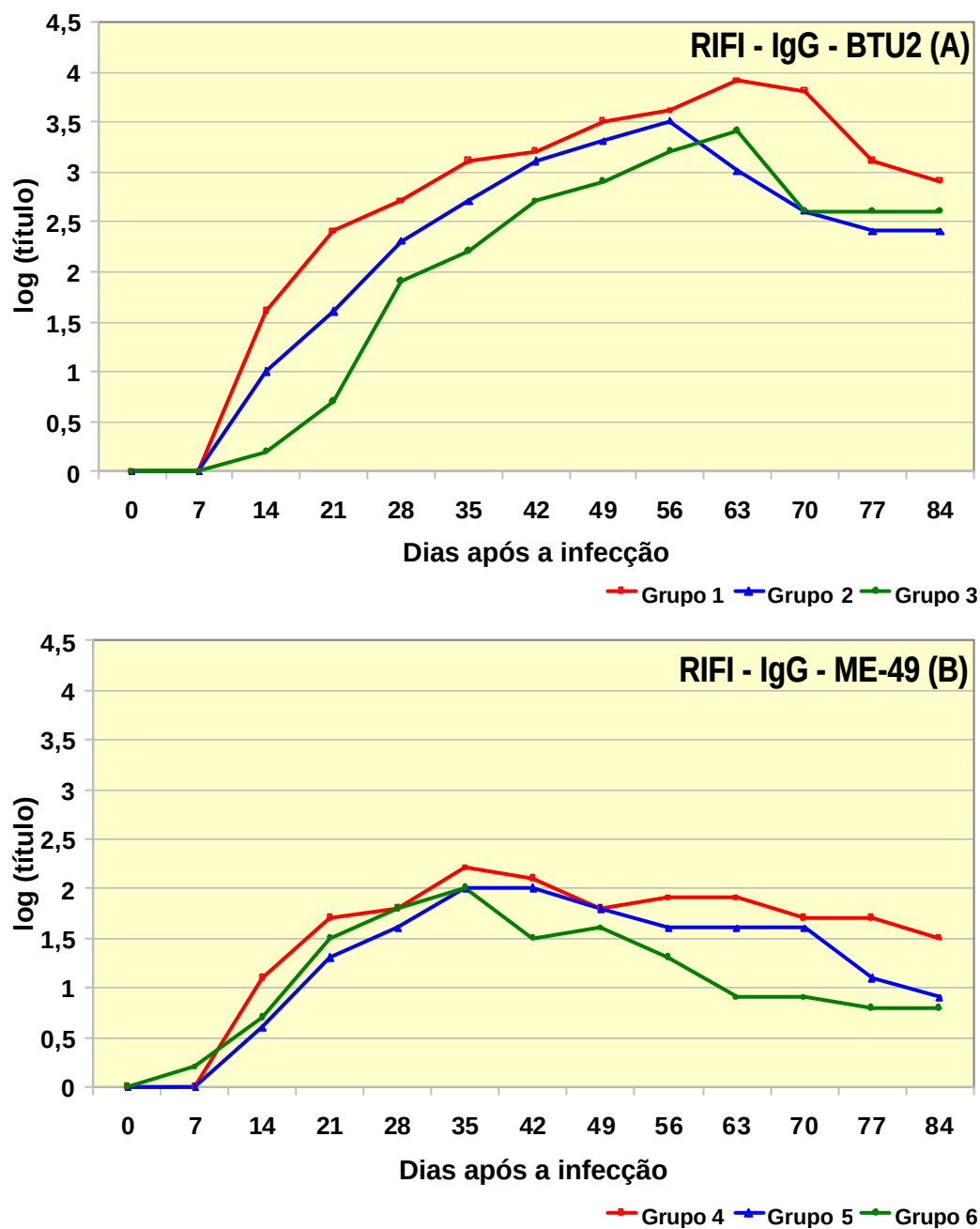


FIGURA 3. Média dos log dos títulos ao exame sorológico pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG, anti-*T.gondii*, em soros de ratos experimentalmente infectados com 10^5 (Grupo 1), 10^4 (Grupo 2) e 10^3 bradizoítos (Grupo 3) de *T.gondii* cepa BTU-2 (A), e infectados com 10^5 (Grupo 4), 10^4 (Grupo 5) e 10^3 bradizoítos (Grupo 6) de *T.gondii* cepa ME-49 (B). Botucatu, 2002.

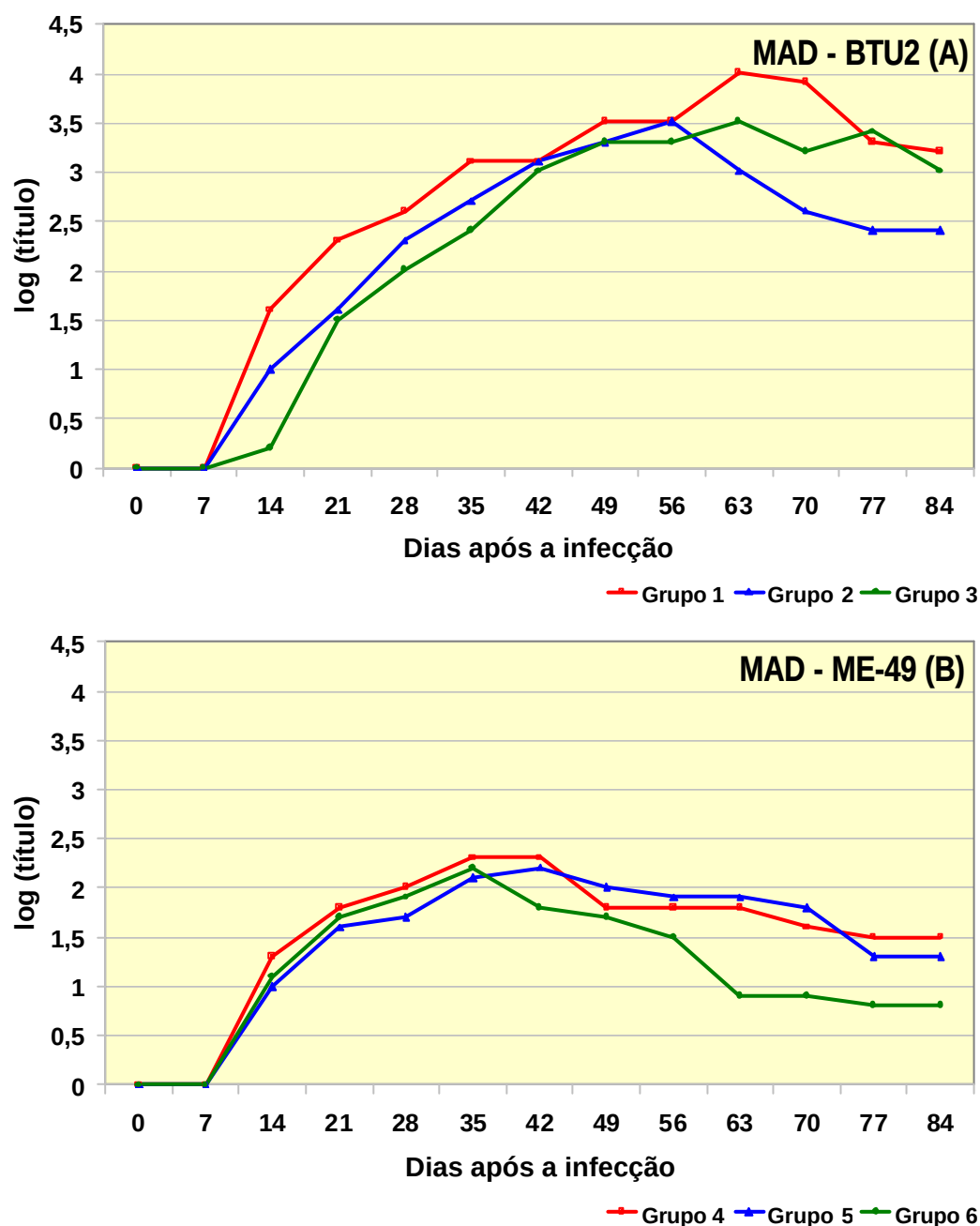


FIGURA 4. Média dos log dos títulos ao exame sorológico pelo método de aglutinação direta (MAD) para detecção de anticorpos anti-*T.gondii*, anti-*T.gondii*, em soros de ratos experimentalmente infectados com 10^5 (Grupo 1), 10^4 (Grupo 2) e 10^3 bradizoítos (Grupo 3) de *T.gondii* cepa BTU-2 (A), e infectados com 10^5 (Grupo 4), 10^4 (Grupo 5) e 10^3 bradizoítos (Grupo 6) de *T.gondii* cepa ME-49 (B). Botucatu, 2002.

4.2 Reisolamento em camundongos

Todos os camundongos inoculados com amostras de cérebro e músculo dos ratos dos grupos 1, 2 e 3, infectados com a cepa BTU-2, morreram durante o período de observação (Tabela 4), sendo confirmada a infecção pelo *T.gondii* pelo encontro de taquizoítos em fluido peritoneal e/ou decalques de fragmentos de fígado, baço e pulmão corados pelo método de Giemsa.

TABELA 4. Mediana da sobrevida (em dias) dos camundongos inoculados com amostras de cérebro ou músculos de ratos experimentalmente infectados com 10^5 (Grupo 1), 10^4 (Grupo 2) e 10^3 bradizoítos (Grupo 3) de *T.gondii* cepa BTU-2. Botucatu, 2002.

Grupo/Tecido	Mediana da sobrevida dos camundongos (em dias) – Rato nº						Mediana da sobrevida (em dias) por Grupo/Tecido
	1	2	3	4	5	6	
Grupo 1/Cérebro	6	8	6	7	7	7	7
Grupo 1/Músculo	9	7	7	10	7	9	7
Grupo 2/Cérebro	8	9	7	11	8	9	8,5
Grupo 2/Músculo	9	12	9	12	8	12	9
Grupo 3/Cérebro	9	9	7	15	12	13	10
Grupo 3/Músculo	10	8	9	10	10	15	10

A Tabela 5 apresenta os resultados do reisolamento em camundongos para os grupos 4, 5 e 6. Nestes grupos apenas dois camundongos (inoculados com material cerebral do animal 1, do grupo 6) adoeceram e morreram aos 30 dias após a inoculação. Dos dois animais foram preparados e examinados a fresco em microscopia óptica, esfregaços do cérebro, onde foram visualizados numerosos cistos teciduais de *T.gondii*. Nos animais que sobreviveram ao período de observação, a infecção por *T.gondii* foi confirmada pela detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* no soro dos camundongos.

Os animais inoculados com amostras de cérebro e músculos dos ratos do Grupo 7 foram observados por 60 dias, não apresentando alterações clínicas, sendo então sacrificados, e ao exame sorológico todos mostraram-se não reagentes.

TABELA 5. Resultado do reisolamento em camundongos inoculados com amostras de cérebro ou músculos de ratos experimentalmente infectados com 10^5 (Grupo 4), 10^4 (Grupo 5) e 10^3 bradizoítos (Grupo 6) de *T.gondii* cepa ME-49. Botucatu, 2002.

Grupo/Tecido	Reisolamento em camundongos – Rato nº						% de P
	1	2	3	4	5	6	
Grupo 4/Cérebro	P	P	P	P	P	P	100,00
Grupo 4/Músculo	P	N	P	N	N	P	50,00
Grupo 5/Cérebro	P	P	P	P	P	P	100,00
Grupo 5/Músculo	N	P	N	N	N	N	16,67
Grupo 6/Cérebro	P	P	N	P	P	N	66,67
Grupo 6/Músculo	P	N	N	N	N	N	16,67

"%"=porcentagem; "N"=negativo; "P"=positivo

Contabilizando todas as amostras de todos os ratos dos três grupos experimentais inoculados com a cepa ME-49 de *T.gondii*, o reisolamento em camundongos foi positivo em 88,89% das amostras de cérebro e em 27,78% das amostras de músculo.

4.3 Reação em cadeia pela polimerase

4.3.1 Limiar de detecção para os diferentes genes de *T.gondii*

As reações em cadeia pela polimerase para detecção do gene SAG-1, B1, codificador de DNA ribossômico (rDNA) e da sequência repetida de 529 pb detectaram respectivamente 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 taquizoítos de *T.gondii* diluídos em suspensão de cérebro de ratos, como pode ser verificado na Figura 7A.

4.3.2 Detecção de DNA de *T.gondii* em amostras de cérebro e músculos dos ratos experimentalmente infectados

A Tabela 6 apresenta os resultados da reação em cadeia pela polimerase para a detecção de DNA de *T.gondii* em amostras de cérebro e músculos dos ratos dos Grupos 1 a 6, o que também pode ser visualizado nas Figuras 7B, 7C, 7D, 8B, 8C e 8D. No caso do Grupo 7 (Controle), as PCRs foram negativas para todas as reações, independente dos oligonucleotídeos utilizados.

Contabilizando todas as amostras de cérebro e músculo, nos três grupos experimentais inoculados com a cepa BTU-2 de *T.gondii*,

para o gene SAG-1 a PCR foi positiva em 27,78%, enquanto que para a detecção do gene B1 em 58,33% das amostras. Para a detecção do gene de rDNA foi positiva em 66,67%, e a detecção do gene repetitivo se deu em 83,33% das amostras testadas. Para os três grupos experimentais inoculados com a cepa ME-49, para o gene SAG-1 a PCR foi positiva em 5,56%, enquanto que para detecção do gene B1 em 44,44% das amostras. Para a detecção do gene de rDNA foi positiva em 41,67%, e a detecção do gene repetitivo se deu em 66,67% das amostras testadas.

De uma forma geral, as PCRs para os genes SAG-1, B1, rDNA e REP foram positivas em 16,67%, 51,39%, 54,16% e 75,00% das amostras testadas, respectivamente. A prova Q de Cochran apontou diferença significativa entre os oligonucleotídeos utilizados ($Q=79,04$; $p<0,01$), e o teste de McNemar apontou que os resultados da PCR para o gene SAG-1 foram significativamente menores que os das outras PCRs ($p<0,01$), que a PCR-B1 não diferiu da PCR-rDNA ($p>0,05$), mas foi menor que a PCR-REP ($p<0,01$), que também foram significativamente maiores que os da PCR-rDNA.

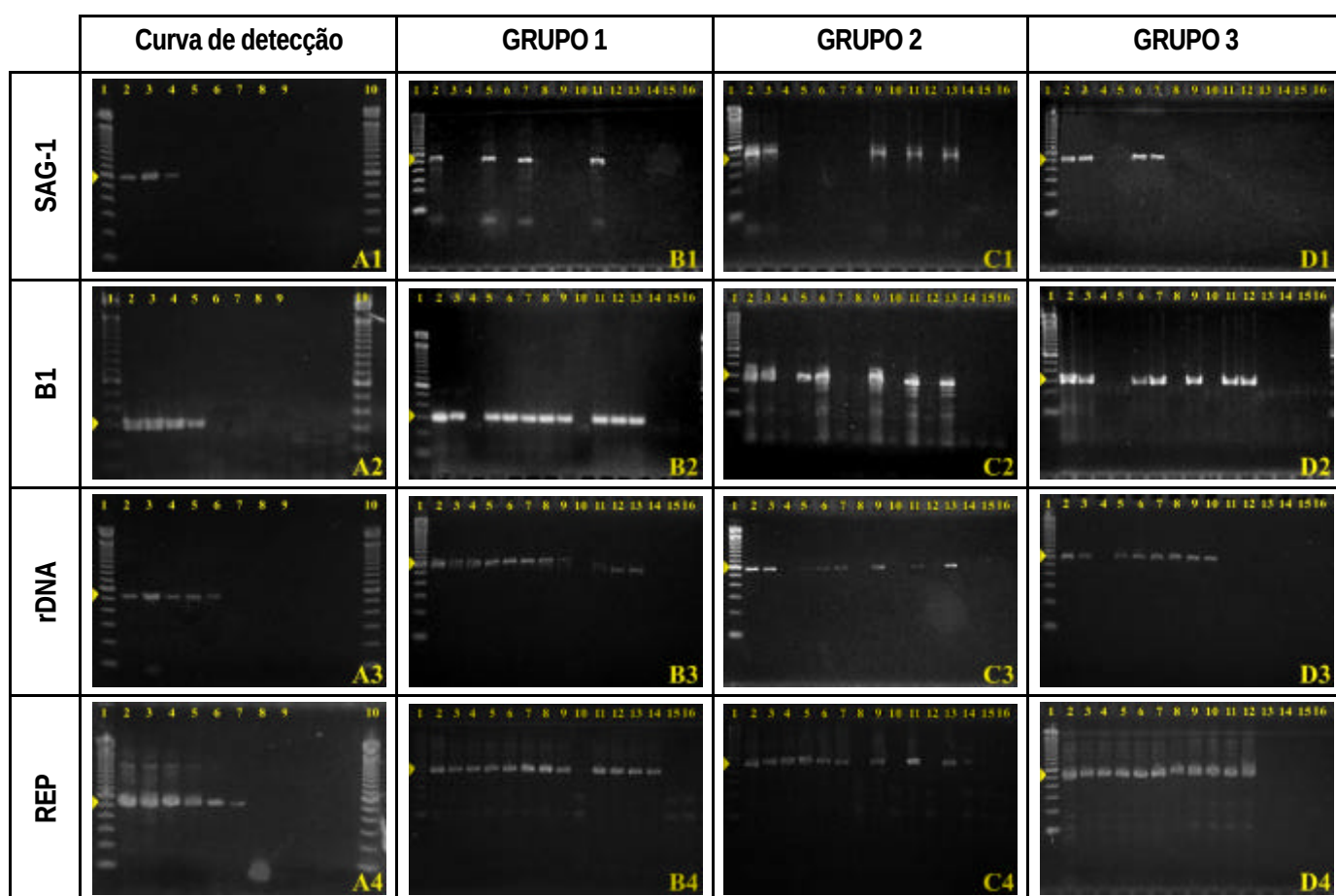


FIGURA 5. Reações em cadeia pela polimerase para detecção de DNA de *T.gondii*. Em A apresentam-se os limiares de detecção de cada PCR e em B, C e D, o resultado da PCR em amostras de cérebro e músculos de ratos experimentalmente infectados com 10^5 (Grupo 1), 10^4 (Grupo 2) e 10^3 bradizoítos (Grupo 3) de *T.gondii* cepa BTU-2. Botucatu, 2002.

A) Limiar de detecção da PCR para o gene SAG-1 (A1), B1 (A2), rDNA (A3) e do gene repetitivo – REP (A4): 1) Padrão de peso molecular 100bp DNA-Ladder Gibco®; 2) 10^5 taquizoítos/ml; 3) 10^4 taquizoítos/ml; 4) 10^3 taquizoítos/ml; 5) 10^2 taquizoítos/ml; 6) 10^1 taquizoítos/ml; 7) 10^0 taquizoítos/ml; 8) cérebro não infectado; 9) reagentes da PCR; 10) Padrão de peso molecular 100bp DNA-Ladder Gibco®.

B) PCR para os genes SAG-1 (B1), B1 (B2), rDNA (B3) e do gene repetitivo – REP (B4), para o Grupo 1: 1) Padrão de peso molecular 100bp DNA-Ladder Gibco®; 2) Controle positivo; 3) Cérebro-Rato 1; 4) Músculo-Rato 1; 5) Cérebro-Rato 2; 6) Músculo-Rato 2; 7) Cérebro-Rato 3; 8) Músculo-Rato 3; 9) Cérebro-Rato 4; 10) Músculo-Rato 4; 11) Cérebro-Rato 5; 12) Músculo-Rato 5; 13) Cérebro-Rato 6; 14) Músculo-Rato 6; 15) tampão de extração; 16) reagentes da PCR.

C) PCR para os genes SAG-1 (C1), B1 (C2), rDNA (C3) e do gene repetitivo – REP (C4), para o Grupo 2: 1) Padrão de peso molecular 100bp DNA-Ladder Gibco®; 2) Controle positivo; 3) Cérebro-Rato 1; 4) Músculo-Rato 1; 5) Cérebro-Rato 2; 6) Músculo-Rato 2; 7) Cérebro-Rato 3; 8) Músculo-Rato 3; 9) Cérebro-Rato 4; 10) Músculo-Rato 4; 11) Cérebro-Rato 5; 12) Músculo-Rato 5; 13) Cérebro-Rato 6; 14) Músculo-Rato 6; 15) tampão de extração; 16) reagentes da PCR.

D) PCR para os genes SAG-1 (D1), B1 (D2), rDNA (D3) e do gene repetitivo – REP (D4), para o Grupo 3: 1) Padrão de peso molecular 100bp DNA-Ladder Gibco®; 2) Controle positivo; 3) Cérebro-Rato 1; 4) Músculo-Rato 1; 5) Cérebro-Rato 2; 6) Músculo-Rato 2; 7) Cérebro-Rato 3; 8) Músculo-Rato 3; 9) Cérebro-Rato 4; 10) Músculo-Rato 4; 11) Cérebro-Rato 5; 12) Músculo-Rato 5; 13) Cérebro-Rato 6; 14) Músculo-Rato 6; 15) tampão de extração; 16) reagentes da PCR.

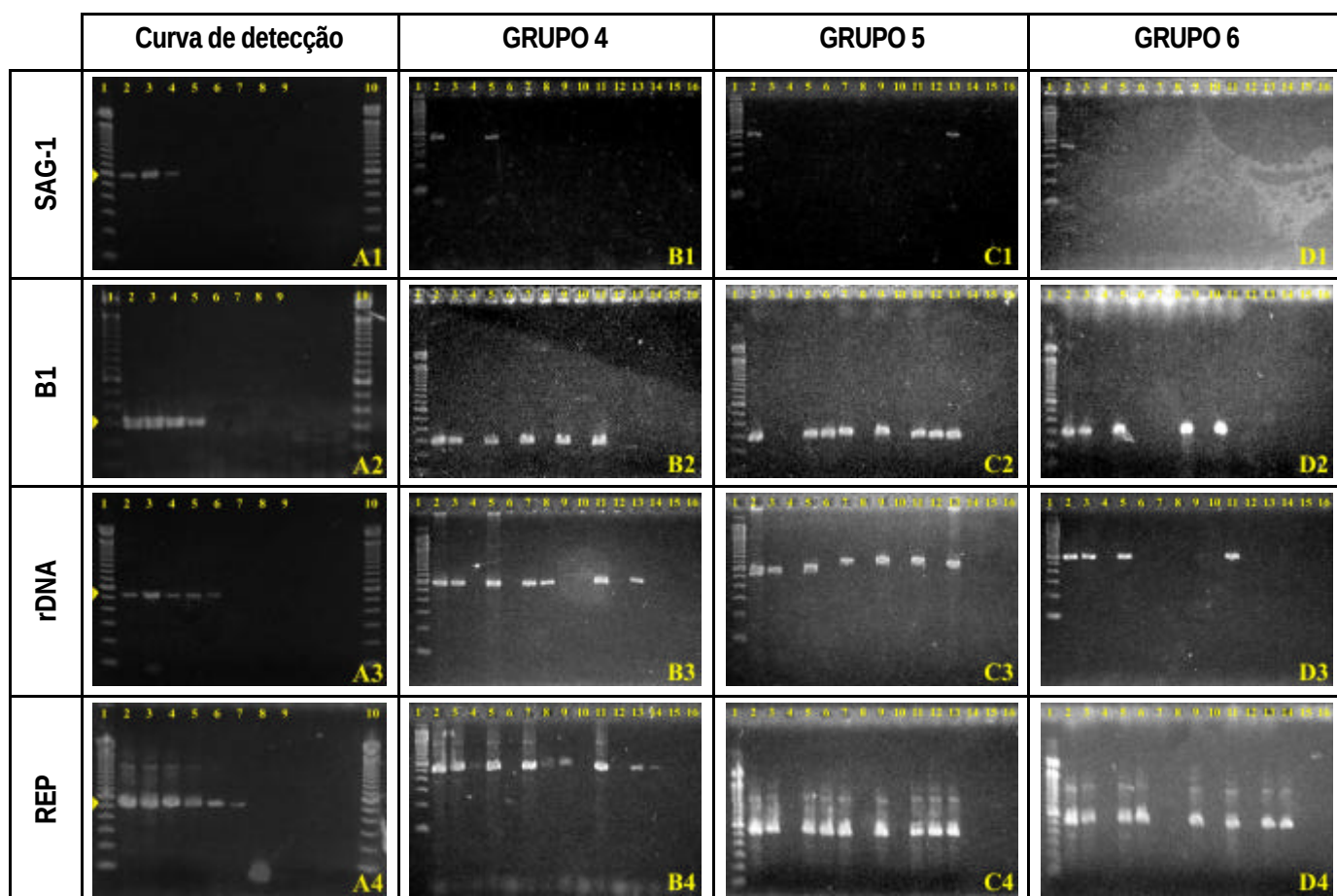


FIGURA 6. Reações em cadeia pela polimerase para detecção de DNA de *T.gondii*. Em A apresentam-se os limiares de detecção de cada PCR e em B, C e D, o resultado da PCR em amostras de cérebro e músculos de ratos experimentalmente infectados com 10^5 (Grupo 4), 10^4 (Grupo 5) e 10^3 bradizoítos (Grupo 6) de *T.gondii* cepa ME-49. Botucatu, 2002.

A) Limiar de detecção da PCR para o gene SAG-1 (A1), B1 (A2), rDNA (A3) e do gene repetitivo – REP (A4): 1) Padrão de peso molecular 100bp DNA-Ladder Gibco®; 2) 10^5 taquizoítos/ml; 3) 10^4 taquizoítos/ml; 4) 10^3 taquizoítos/ml; 5) 10^2 taquizoítos/ml; 6) 10^1 taquizoítos/ml; 7) 10^0 taquizoítos/ml; 8) cérebro não infectado; 9) reagentes da PCR; 10) Padrão de peso molecular 100bp DNA-Ladder Gibco®.

B) PCR para os genes SAG-1 (B1), B1 (B2), rDNA (B3) e do gene repetitivo – REP (B4), para o Grupo 4: 1) Padrão de peso molecular 100bp DNA-Ladder Gibco®; 2) Controle positivo; 3) Cérebro-Rato 1; 4) Músculo-Rato 1; 5) Cérebro-Rato 2; 6) Músculo-Rato 2; 7) Cérebro-Rato 3; 8) Músculo-Rato 3; 9) Cérebro-Rato 4; 10) Músculo-Rato 4; 11) Cérebro-Rato 5; 12) Músculo-Rato 5; 13) Cérebro-Rato 6; 14) Músculo-Rato 6; 15) tampão de extração; 16) reagentes da PCR.

C) PCR para os genes SAG-1 (C1), B1 (C2), rDNA (C3) e do gene repetitivo – REP (C4), para o Grupo 5: 1) Padrão de peso molecular 100bp DNA-Ladder Gibco®; 2) Controle positivo; 3) Cérebro-Rato 1; 4) Músculo-Rato 1; 5) Cérebro-Rato 2; 6) Músculo-Rato 2; 7) Cérebro-Rato 3; 8) Músculo-Rato 3; 9) Cérebro-Rato 4; 10) Músculo-Rato 4; 11) Cérebro-Rato 5; 12) Músculo-Rato 5; 13) Cérebro-Rato 6; 14) Músculo-Rato 6; 15) tampão de extração; 16) reagentes da PCR.

D) PCR para os genes SAG-1 (D1), B1 (D2), rDNA (D3) e do gene repetitivo – REP (D4), para o Grupo 6: 1) Padrão de peso molecular 100bp DNA-Ladder Gibco®; 2) Controle positivo; 3) Cérebro-Rato 1; 4) Músculo-Rato 1; 5) Cérebro-Rato 2; 6) Músculo-Rato 2; 7) Cérebro-Rato 3; 8) Músculo-Rato 3; 9) Cérebro-Rato 4; 10) Músculo-Rato 4; 11) Cérebro-Rato 5; 12) Músculo-Rato 5; 13) Cérebro-Rato 6; 14) Músculo-Rato 6; 15) tampão de extração; 16) reagentes da PCR.

TABELA 6. Resultados da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de DNA de *T.gondii* (genes SAG-1, B1, rDNA e REP) em amostras de cérebro e musculatura de ratos experimentalmente infectados com 10^5 (Grupo 1 - G1), 10^4 (Grupo 2 - G2) e 10^3 bradizoítos (Grupo 3 - G3) de *T.gondii* cepa BTU-2, e 10^5 (Grupo 4 - G4), 10^4 (Grupo 5 - G5) e 10^3 bradizoítos (Grupo 6 - G6) de *T.gondii* cepa ME-49. Botucatu, 2002.

Grupo/ Tecido	PCR-SAG-1						PCR-B1						PCR-rDNA						PCR-REP					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
G1/Cérebro	N	P	P	N	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
G1/Músculo	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	P	N	P	P	P	N	P	N	P	P	P	N	P	P
G2/Cérebro	P	N	N	P	P	P	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
G2/Músculo	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P
G3/Cérebro	P	N	P	N	N	N	P	N	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N
G3/Músculo	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	N	P	P	N	N	N	P	P	P	P	P	N
G4/Cérebro	N	P	N	N	N	N	P	P	P	P	P	N	P	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P
G4/Músculo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	P	N	N	P
G5/Cérebro	N	N	N	N	N	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
G5/Músculo	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N
G6/Cérebro	N	N	N	N	N	N	P	P	N	P	P	N	P	P	N	N	P	N	P	P	N	P	P	P
G6/Músculo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	P

"N"=negativo; "P"=positivo

4.4 Concordância dos resultados do reisolamento em camundongos, sorologia e PCR

A concordância dos resultados dos métodos sorológicos, considerados no 84^º DPI, e do reisolamento em camundongos é apresentada na Tabela 7, enquanto que a concordância do reisolamento em camundongos e das PCRs é apresentada na Tabela 8. Em alguns casos não foi possível calcular o índice de concordância kappa, devido a distribuição dos resultados, sendo então apresentada a concordância observada.

Como se depreende da Tabela 7, para os Grupos 1, 2 e 3, inoculados com a cepa BTU-2, onde o reisolamento de *T.gondii* se deu em todos os animais, independente do tecido inoculado, a concordância do exame sorológico com o resultado do reisolamento foi sempre alta para a detecção de IgM, e perfeita no caso da RIFI-IgG e do MAD. Já para os animais inoculados com a cepa ME-49, a concordância da RIFI-IgM com o reisolamento foi baixa, já que muitos animais apresentavam resultados negativos para anticorpos desta classe. Para os resultados da RIFI-IgG e do MAD, a concordância foi alta quando comparada ao reisolamento do cérebro, mas baixa quando confrontada ao reisolamento

a partir das amostras de musculatura, devido a baixa porcentagem de recuperação desta cepa a partir destas amostras.

A concordância da PCR e do reisolamento foi alta nos casos de detecção do parasita no cérebro, indicando a presença do parasita em concentração suficiente para a detecção pelos diferentes oligonucleotídeos utilizados. Para as amostras de musculatura, entretanto, apenas a PCR-REP apresentou concordância de moderada a elevada, com os resultados do reisolamento do parasita em camundongos.

TABELA 7. Concordância dos resultados do reisolamento em camundongos de amostras de cérebro e músculo de ratos inoculados com *T.gondii* cepas BTU-2 e ME-49, e do exame sorológico pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgM e IgG anti-*T.gondii*, e pelo método de aglutinação direta (MAD). Botucatu, 2002.

Cepa/Tecido	Comparação (reisolamento em camundongos X)	Concordância (k)
BTU-2/Cérebro	RIFI-IgM	0,72*
	RIFI-IgG	1,00*
	MAD	1,00*
BTU-2/Músculo	RIFI-IgM	0,72*
	RIFI-IgG	1,00*
	MAD	1,00*
ME-49/Cérebro	RIFI-IgM	0,03
	RIFI-IgG	0,67*
	MAD	0,78*
ME-49/Músculo	RIFI-IgM	0,15
	RIFI-IgG	0,20
	MAD	0,09

*= concordância observada.

TABELA 8. Concordância dos resultados do reisolamento em camundongos e da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de DNA de *T.gondii* (genes SAG-1, B1, rDNA e REP) de amostras de cérebro e músculo de ratos inoculados com *T.gondii* cepas BTU-2 e ME-49. Botucatu, 2002.

Cepa/Tecido	Comparação (reisolamento em camundongos X)	Concordância (k)
BTU-2/Cérebro	PCR-SAG-1	0,50
	PCR-B1	0,83
	PCR-rDNA	0,94
	PCR-REP	0,94
BTU-2/Músculo	PCR-SAG-1	0,05
	PCR-B1	0,33
	PCR-rDNA	0,39
	PCR-REP	0,72
ME-49/Cérebro	PCR-SAG-1	0,03
	PCR-B1	0,61
	PCR-rDNA	0,61
	PCR-REP	0,64
ME-49/Músculo	PCR-SAG-1	0,72*
	PCR-B1	0,15
	PCR-rDNA	0,26
	PCR-REP	0,51

*= concordância observada.

4.5 Genotipagem da cepa BTU-2 de *T.gondii*

O resultado da genotipagem da cepa BTU-2 de *T.gondii* é apresentado na Figura 10, onde se evidencia que a mesma tem perfil de restrição compatível com o genótipo III.

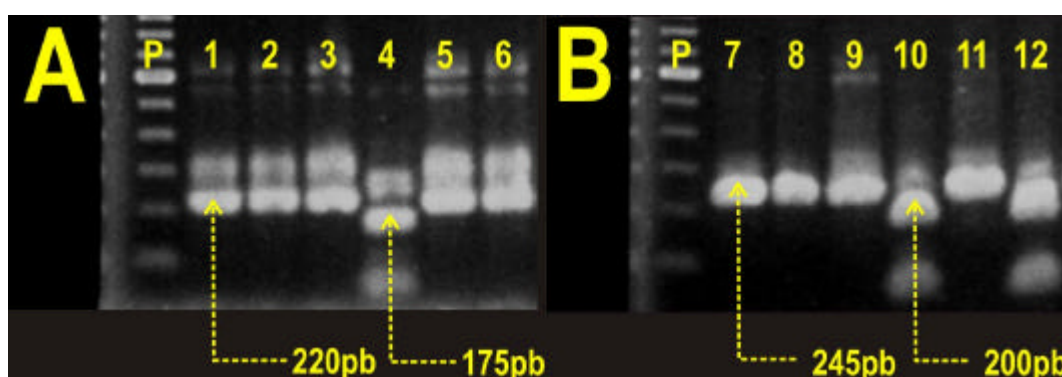


FIGURA 7. Polimorfismo do gene SAG-2 das cepas de BTU-2 de *T.gondii*, avaliada pela *nested*-PCR seguida de corte pelas enzimas de restrição *HhaI* e *Sau3AI*.

A) *nested*-PCR da extremidade 3' do gene SAG-2. P = Padrão de peso molecular 100bp DNA-Ladder Gibco®; 1, 3, 5 = cepas RH, ME-49, BTU-2, respectivamente; 2, 4, 6 = cepas RH, ME-49, BTU-2, respectivamente, após incubação com a enzima de restrição *HhaI*.

B) *nested*-PCR da extremidade 5' do gene SAG-2. P = Padrão de peso molecular 100bp DNA-Ladder Gibco®; 7, 9, 11 = cepas RH, ME-49 e BTU-2, respectivamente; 8, 10, 12 = cepas RH, M7741 e BTU-2, respectivamente, após incubação com a enzima de restrição *Sau3AI*.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Não observou-se nenhuma alteração clínica nos animais inoculados, independente da dose e cepa utilizada na infecção experimental. Os ratos da espécie *Rattus norvegicus* são considerados os hospedeiros mais resistentes ao desenvolvimento da enfermidade clínica pelo *T.gondii*¹⁵. Entretanto, esta espécie não é resistente à infecção, nem mesmo imune ao desenvolvimento do quadro clínico e ao óbito devido as lesões causadas pelo parasita.

Fujii *et al.*⁵⁵ inocularam ratos Fischer, WM/Ms e WKY com doses de 10^3 a 10^7 taquizoítos da cepa RH, pela via intraperitoneal. Todos os ratos WM/Ms e WKY resistiram a infecção com 10^7 taquizoítos, mas cinco dos sete ratos Fischer não resistiram a esta dose. O parasita foi reisolado do cérebro de cinco de oito ratos Fischer inoculados com 10^5 parasitas e dos dois inoculados com 10^7 . Entre os ratos WM/Ms e WKY, o reisolamento se deu em quatro de sete e três de sete animais inoculados, respectivamente.

Chinchilla *et al.*¹⁸ apontam como dose letal, independente da idade do animal, 10^8 parasitas. Já com 10^7 parasitas apenas animais entre um e dez dias de idade morreram. Concluem que a resistência do rato ao parasita não depende da via de infecção, e que a idade dos animais não é um fator importante de susceptibilidade desta espécie, pois

mesmo animais recém-nascidos requerem doses de 10^7 a 10^8 taquizoítos da cepa RH para morrerem.

Dubey²⁵ inoculou ratas Sprague-Dawley de 44 dias de idade com doses de 10^0 a 10^7 oocistos da cepa VEG, de baixa virulência para camundongos, classificada como genótipo III. Os animais inoculados com 10^5 a 10^6 oocistos adoeceram, apresentando diarreia e depressão. Três de cinco ratas inoculadas com 10^6 oocistos morreram no sétimo ou oitavo DPI, enquanto que todos os outros animais permaneceram saudáveis. Estes animais apresentavam lesões e taquizoítos em intestino, linfonodos mesentéricos, fígado, baço, pulmão, coração, adrenais, linfonodos renais, língua, musculatura e cérebro. As lesões predominantes eram necrose transmural intestinal, necrose dos linfonodos mesentéricos e pneumonia intersticial. O número de cistos cerebrais ao exame direto do órgão variou de 180 a 2650, de acordo com o tamanho do inóculo. Pelo exame histopatológico foram encontrados cistos no cérebro, coração e língua. Em apenas um rato inoculado com 10 oocistos foi encontrado um cisto na musculatura. Lesões neurológicas foram encontradas em todos os grupos. Infiltrado mononuclear pericapilar foi encontrado em 21 de 30 (70%) animais, infiltrado mononuclear perivascular meníngeo foi encontrado em seis de 30 (20%) animais, enquanto que 15 de 30 (50%) animais apresentavam nódulos gliais multifocais ou grupos de células da glia ou mononucleares. Foram observados focos de necrose em nódulos gliais e cistos degenerados em

quatro ratos. Conclui-se que os oocistos são altamente infectantes para os ratos e que a virulência é dose-dependente. Em geral, as infecções por oocistos são mais severas nos hospedeiros intermediários do que aquelas induzidas por cistos⁴⁶.

Kempf *et al.*⁵⁶ inocularam ratas Lewis e Fischer, com idade entre oito e dez semanas, com três diferentes cepas de *T.gondii*: CT-1, altamente virulenta, NED e NTE, de baixa virulência. Nestes animais foi realizada a contagem de cistos cerebrais. Nos animais da linhagem Lewis não foram observados cistos cerebrais, independente da cepa de *T.gondii* inoculada. Nos animais Fischer, o número de cistos cerebrais foi maior para a cepa NED, com número médio de cistos por cérebro de 439 aos dois meses PI e 509 aos quatro meses PI. Para a cepa CT-1, nas ratas Fischer a contagem de cistos foi de 17 aos dois meses PI e zero aos quatro meses PI, entretanto a taxa de infecção de camundongos inoculados com macerado de cérebros de ratos Fischer inoculados com a cepa CT-1 foi de 100%, enquanto que para a cepa NED foi de 75%.

A infecção dos ratos pelo *T.gondii*, e as taxas de mortalidade eventualmente associadas, estão intimamente relacionadas à quantidade de parasitas inoculada, bem como ao estágio infectante, sendo que as infecções causadas por oocistos normalmente são mais severas que as causadas por taquizóitos e bradizóitos. As doses mais

elevadas utilizadas no presente estudo, 10^5 bradizóitos, estão abaixo daquelas consideradas letais em outros trabalhos, o que corrobora a ausência de mortalidade entre os grupos experimentais. Cabe ressaltar também que a resposta dos ratos não é homogênea, com grande influência da constituição genética dos animais na resposta ao *T.gondii*, como se depreende dos trabalhos de Fujii *et al.*⁵⁵ e Kempf *et al.*⁵⁶. Outro trabalho que aponta esta diferença é o de Paulino & Vitor⁵⁷, onde todas as fêmeas Wistar e Holtzman inoculadas foram infectadas, entretanto a frequência de toxoplasmose congênita foi maior nas fêmeas Wistar do que nas Holtzman.

5.1 Exame sorológico

Dubey & Frenkel¹⁵ apontam que nenhum dos testes sorológicos disponíveis para a avaliação de anticorpos anti-*Toxoplasma* em ratos foi devidamente avaliado para indicar a infecção latente nesta espécie. Para a maioria das espécies mais frequentemente estudadas, títulos de anticorpos de 64 ao teste de aglutinação ao látex (LAT) e a hemaglutinação indireta (HAI), 16 para o teste de Sabin-Feldman (SF) e para a imunofluorescência (RIFI), bem como 25 para o método de aglutinação modificado (MAD), são considerados específicos, mas por outro lado, nenhum deles deve ser considerado definitivo, pois o parasita já foi isolado de ratos e de seres humanos soronegativos, e por outro

lado, em alguns casos não foi reisolado de ratos com altos títulos de anticorpos¹⁵.

Desta forma, o objetivo de se estudar as curvas de anticorpos séricos das classes IgM e IgG pela RIFI, e a resposta ao MAD, foi traçar o perfil de evolução dos títulos destes anticorpos, como subsídio para a interpretação destes testes nesta espécie. Uma vez que os títulos obtidos com a RIFI são comparáveis àqueles obtidos ao teste de Sabin-Feldman⁵⁸, a discussão baseia-se em trabalhos que utilizaram este teste, tentando desta forma traçar um paralelo entre estes resultados com os obtidos na RIFI.

Todos os animais inoculados, independente da dose e cepas utilizadas soroconverteram a partir dos sete DPI, corroborando os resultados de trabalhos^{18,23,27,55,59} que demonstram a soroconversão em todos os animais inoculados.

Eyles⁵⁹ inoculou ratos com 5000 ou 50000 taquizoítos de uma cepa virulenta para camundongos, verificando a soroconversão pelo teste de SF. Todos os animais soroconverteram, sendo que 29% eram positivos aos quatro DPI. O pico de anticorpos variou dos sete aos 30 DPI, com média de 15 DPI. O título do pico variou de 64 a 65536, com mediana de 4096. Nos dois meses seguintes, o título caiu para 1/8, em seis meses chegou a 64 e em um ano a 16. Os ratos tiveram títulos

duradouros, não sendo detectadas diferenças na resposta entre animais inoculados com 5000 ou 50000 taquizoítos.

Remington & Hackman²⁸ inocularam fêmeas Sprague-Dawley de 150 a 250g com 10^6 taquizoítos da cepa RH pela via intraperitoneal, detectando anticorpos séricos pelo SF. O início da detecção deu-se já aos três DPI, com título mediano de 532, pico mediano de 16000 aos oito DPI e título máximo individual de 16000.

Godard *et al.*³¹ estudaram a cinética sérica da IgA, IgM e IgG em ratos Fischer de 10 semanas de idade, inoculados com taquizoítos da cepa RH ou cistos da cepa 76K. A IgA foi detectada a partir dos sete DPI, com pico entre os 40 e 70 DPI, quando houve queda do nível de anticorpos, entretanto com detecção contínua até os 300 DPI. A IgM foi detectada a partir dos sete DPI, com pico aos nove DPI e manteve-se elevada além dos 120 DPI. A IgG foi detectada a partir dos dez DPI, com pico aos 70 DPI e manteve-se elevada além dos 120 DPI. Estudaram também a especificidade da IgA detectada, pelo *immunoblotting*, verificando que aos 17 DPI os anticorpos reagem com antígenos de 29, 30 e 38 kDa. A partir dos 41 DPI, a resposta era dirigida a antígenos de 28,5, 35, 43, 50 e 75 a 90 kDa. A resposta a antígenos de 30 e 35 kDa é similar à resposta humana, dando suporte à utilização deste modelo para estudo comparativo da infecção humana.

Com relação ao início da detecção de anticorpos, os resultados desta pesquisa demonstraram uma resposta mais tardia, com poucos animais apresentando títulos de anticorpos aos sete DPI. Dos dezoito animais inoculados com a cepa BTU-2, seis (33,3%) apresentavam título 16 para IgM aos sete DPI, e nos animais inoculados com a cepa ME-49, 13 (72,22%) apresentavam título 16 para IgM aos 14 DPI. Estes resultados contrastam com os quatro e três DPI para o início da produção de anticorpos nos trabalhos de Eyles⁵⁹ e Remington & Hackman²⁸, e esta variação pode estar relacionada principalmente à via de inoculação utilizada. Godard *et al.*³¹, por outro lado, encontraram soroconversão a partir dos sete DPI para IgM e a partir dos 10 DPI para IgG, aproximando-se dos resultados obtidos nesta pesquisa.

O pico mediano de anticorpos IgG, detectados pela RIFI, foi mais precoce para a cepa ME-49, entre o 28º e 35º DPI, do que para a cepa BTU-2, que se deu entre o 56º e 63º DPI. O título individual mais elevado entre os animais inoculados com a cepa ME-49 foi 256, enquanto que para a cepa BTU-2 foi 65536. Outros trabalhos apontam também discrepâncias nos títulos máximos observados entre cepas de diferente virulência para camundongos, mas geralmente com títulos mais precoces para as cepas de alta virulência.

Lunde & Jacobs²⁷ inocularam ratos das variedades Osborn-Mendel ou Sprague-Dawley, com 1000 parasitas das cepas RH e

113-CE, pela via intraperitoneal, detectando títulos ao teste de Sabin-Feldman (SF) maiores, mais precoces e de maior duração do que aqueles detectados pelo teste de hemaglutinação (HA). Para a cepa RH obteve um título mediano de 1024 aos cinco DPI, com pico mediano de 16000 aos 14 DPI, mas com títulos de 16000 já aos nove DPI. Para a cepa 113-CE, o título mediano de 32 foi detectado aos cinco DPI, com pico mediano de 8000 aos 14 DPI, e título máximo individual de 16000 aos 14 DPI.

Calderón & Thiermann²⁹ inocularam ratos machos de 60 dias de idade, da variedade AxC, com $1,8 \times 10^7$ taquizoítos da cepa RH ou 60 cistos teciduais da cepa ALT, avirulenta para camundongos, pela via intraperitoneal. A resposta sorológica induzida pela cepa RH, verificada pelo teste de SF, foi mais precoce e elevada, com título mediano de 16 aos dois DPI e pico de 48000 aos oito DPI, com título máximo individual de 64000 aos oito DPI. Para a cepa ALT, a resposta sorológica foi detectada apenas a partir dos sete DPI, com título mediano de 64, pico de 6000 aos 49 DPI e título máximo individual de 8000 aos 49 DPI.

Henry & Beverley²² inocularam ratos de 300g com 100 cistos teciduais, pela via subcutânea, de uma cepa de *T.gondii* de baixa virulência para camundongos. Ao teste de SF os ratos ainda estavam negativos aos nove DPI, apresentando título máximo de 220 aos 23 DPI.

Os títulos encontrados pelo MAD foram mais elevados neste estudo que aqueles observados a RIF-IgG. Dubey²⁵, por outro

lado, inoculou ratas Sprague-Dawley de 44 dias de idade com oocistos esporulados da cepa VEG, caracterizada como sendo genótipo III e avirulenta para camundongos. Anticorpos foram detectados por todos os testes de aglutinação utilizados, mas os títulos pelo MAD foram mais elevados, entre 16000 e 32000, que os obtidos nos teste de HA ou LAT. No MAD os títulos se elevaram mais de oito vezes entre os 29 e 75 DPI. De Champs *et al.*⁶⁰ verificaram soroconversão pela MAD em ratos Fischer de cinco semanas de idade inoculados com 10^7 taquizoítos da cepa RH, e em ratos Wistar de sete a 46 dias de idade, inoculados com 10^2 , 10^4 ou 10^8 taquizoítos da cepa RH. Em todos os animais esta ocorreu com títulos de 4000 às cinco SPI.

Dubey *et al.*⁶¹ citam que os títulos sorológicos obtidos pela MAD normalmente são mais elevados que aqueles encontrados ao SF, e que a MAD normalmente é mais sensível que outros testes de aglutinação, tais como a aglutinação ao látex e a hemaglutinação, provavelmente devido aos diferentes anticorpos detectados em cada teste.

5.2 Reisolamento em camundongos

A influência do genótipo do parasita ficou evidente nos resultados do reisolamento em camundongos. Os animais inoculados com 10^4 e 10^3 parasitas da cepa ME-49 aparentemente foram capazes de

eliminar o parasita da musculatura, e mesmo do cérebro, quando inoculados com 10^3 bradizoítos.

No trabalho de Zenner *et al.*¹⁴ o parasita não se manteve na musculatura, apesar de ter-se pesquisado somente no diafragma. No presente estudo, nos animais inoculados com a cepa BTU-2, classificada como genótipo III, recuperou-se o parasita em todas as amostras de musculatura examinadas. Jacobs & Melton⁶² verificaram a distribuição do *T.gondii* em músculos de ratos cronicamente infectados, examinando amostras de diafragma, músculo peitoral, abdominal e de membros posteriores. Nos animais inoculados com as cepas CH e LB eles foram positivos aos três e quatro meses após a infecção, respectivamente. Nos ratos infectados com a cepa 113-CE, de baixa virulência para camundongos, o parasita foi recuperado do cérebro até as seis semanas após a inoculação, enquanto que não foi recuperado da musculatura, resultado em parte semelhante ao obtido neste trabalho com a cepa ME-49.

Dubey²⁶ também detectou o parasita em vários órgãos de ratas Sprague-Dawley adultas inoculadas com oocistos das cepas VEG, de baixa virulência, genótipo III, e GT-1, de alta virulência, genótipo I. Para verificar a manutenção do parasita nos órgãos dos animais infectados realizou-se o isolamento em camundongos a partir de amostras de estômago, olhos, pulmão, cérebro, rim, útero, língua, baço, coração e

linfonodos. Aos 76 DPI de um oocisto da cepa VEG, cistos foram encontrados no cérebro, músculos, pulmões e rins. Aos 240 DPI de 10^5 oocistos da cepa VEG foram encontrados cistos no cérebro, músculos, coração, cérebro, língua, olhos, pulmões, rins, linfonodos e intestino. Aos 443 DPI de 10^4 oocistos da cepa GT-1 foram encontrados cistos no cérebro, músculos, coração, língua, pulmões, fígado, baço, rim, útero, intestino e estômago. A recuperação do parasita de órgãos não neurais evidencia o papel dos ratos como fontes de infecção para suínos e gatos. Apesar da virulência da cepa utilizada, o parasita foi encontrado inclusive na musculatura dos animais infectados, contrastando com os resultados deste experimento, onde o parasita foi recuperado com menor frequência das amostras de musculatura, pós-infecções pela cepa ME-49.

O trabalho de Dubey²³ demonstrou que a infectividade dos bradizoítos varia com a via de inoculação, sendo cerca de 100 vezes menor pela via oral quando comparada com a via subcutânea. Independente da cepa utilizada, este autor mostrou que a dose infectante oral mínima é de 10^3 bradizoítos, corroborando os resultados encontrados nesta pesquisa.

No caso específico da cepa de baixa virulência utilizada neste experimento, a ME-49, a recuperação do parasita a partir das amostras de musculatura foi irregular. Guerreiro e Chinchilla⁶³ inocularam

ratos Sprague-Dawley de 150 a 200g com 10^5 oocistos da cepa TCR-2, de baixa virulência, pela via oral. No sangue e no lavado peritoneal os parasitas foram encontrados até o quinto DPI. No fígado, pulmão, linfonodos e baço houve diminuição na frequência de observação dos parasitas, que não foram observados a partir do 30 DPI. A partir dos 30 DPI os parasitas foram observados constantemente nas amostras de coração e cérebro, mas com maior frequência neste último, resultado similar ao obtido nesta pesquisa.

Da mesma forma, Dubey⁶⁴ estudou o tropismo tecidual de oocistos de *T.gondii* da cepa VEG, genótipo III, mas de baixa virulência, inoculada pela via oral em ratas Sprague-Dawley de 100g. Os tecidos estudados foram pulmões, cérebro, língua, baço, coração, olhos, linfonodos mesentéricos, rins, fígado, musculatura e intestino delgado, sendo os animais sacrificados aos 21, 29, 64 e 237 DPI. Cistos teciduais foram encontrados em todas as situações, com maior frequência no cérebro, musculatura esquelética, coração e rins. No caso dos cérebros, todos os camundongos inoculados foram infectados, independente do dia de obtenção das amostras. A musculatura esquelética seguiu padrão semelhante, exceto a amostra dos 64 DPI onde apenas dois de quatro camundongos foram infectados. Nos corações só não houve reisolamento aos 21 DPI, onde dois de quatro animais foram infectados. Nas amostras de língua, o reisolamento em camundongos foi obtido apenas nas amostras colhidas aos 29 e 237 DPI.

Freyre *et al.*⁶⁵ inocularam cistos teciduais, pela via oral, de 15 diferentes cepas de *T.gondii*, em doses de dois, 20, 200 ou 1000 cistos, em ratos Wistar, e após dois meses de infecção, verificaram a presença de cistos no cérebro, pelo exame a fresco de esfregaços do tecido. Dos animais com resultado negativo, o material colhido era inoculado em camundongos para confirmação. De 411 animais inoculados, 323 (78,6%) estavam infectados após dois meses. Pelo menos 100 cistos foram necessários para infectar mais de 90% dos ratos e com doses baixas 60% deles apresentavam cistos cerebrais. A microscopia direta foi eficiente em apenas 146 (35,5%) dos 411 animais, reforçando a importância do isolamento em camundongos como prova definitiva para a demonstração da infecção. Nos quatro ratos inoculados com dois cistos da cepa ME-49, em três foram observados cistos à microscopia e um permaneceu negativo, mesmo após passagem cega em camundongos. Resposta semelhante foi encontrada nas inoculações com 20 cistos teciduais. Já nos seis animais inoculados com 1000 cistos de ME49, não foram encontrados cistos no cérebro de nenhum deles, e em três casos os camundongos se infectaram após a inoculação do material cerebral dos ratos. A eliminação do *T.gondii* do cérebro de alguns ratos pode ser a explicação para a taxa de 13% de bioensaios negativos. Uma outra explicação pode ser a resistência individual natural dos animais, ou a variação entre as linhagens de ratos.

Outros trabalhos verificaram, em cepas com característica de alta ou baixa virulência, isoladamente, a manutenção do parasita em ratos inoculados. Ruchman & Fowler¹⁷ inocularam ratos de 300 a 350g com taquizoítos da cepa RH pela via intraperitoneal, verificando o reisolamento do agente do cérebro a partir do quarto DPI e por até dois anos após a infecção. Henry & Beverley²², inoculando ratos de 300g com 100 cistos de uma cepa de baixa virulência para camundongos, pela via subcutânea, reisolaram o parasita de um de 12 baços examinados aos 23 DPI e de 5/28 cérebros aos 86 DPI, o que foi possível apenas nos animais em que a titulação ao teste de SF era superior a 100. Guerrero *et al.*²⁴ inocularam ratos Sprague-Dawley com idades variando de 1 a 15 dias, com 10^4 a 10^7 oocistos de uma cepa de *T.gondii* de baixa virulência para camundongos, pela via oral, e examinaram macerado direto do cérebro e cortes histológicos de cérebro, fígado, baço, pulmão e linfonodos, após 30 dias da infecção. Como resultados, encontraram 20 a 80% dos ratos de um a cinco dias de idade, com cistos cerebrais quando inoculados com 10^4 e 10^5 oocistos. Independente do inóculo, 50% dos ratos com 10 dias apresentavam cistos. Os ratos de 15 e trinta dias também apresentavam cistos, em taxas superiores a 80%.

Alguns trabalhos demonstram que além de uma influência da virulência da cepa, existe uma interação com a linhagem de rato utilizada para a infecção experimental. Fujii *et al.*⁵⁵ inocularam ratos Fischer, WM/Ms e WKY com doses de 10^3 a 10^7 taquizoítos da cepa RH,

pela via intraperitoneal. Todos os ratos WM/Ms e WKY resistiram a infecção com 10^7 taquizoítos, mas cinco dos sete ratos Fischer inoculados não resisitiram. O parasita foi reisolado do cérebro de cinco de oito ratos Fischer inoculados com 10^5 parasitas e dos dois inoculados com 10^7 . Entre os ratos WM/Ms e WKY, o reisolamento se deu em quatro de sete e três de sete animais inoculados, respectivamente.

Paulino & Vitor⁵⁷ detectaram que todas as fêmeas inoculadas desenvolveram títulos de anticorpos, mas apenas aquelas que receberam a cepa P, isolada de cão, que é de baixa virulência para camundongos, apresentaram cistos cerebrais. A cepa N, isolada de coelho, que é altamente virulenta para camundongos, além de não induzir a formação de cistos cerebrais, não promoveu a infecção congênita. A frequência de toxoplasmose congênita foi maior nas fêmeas Wistar, entre 11,4% a 22,8%, dependendo da dose inoculada, em comparação com as ratas Holtzman, onde a taxa foi de 2,9%. Para a linhagem Lewis, Kempf *et al.*⁵⁶ não observaram cistos cerebrais, independente da cepa de *T.gondii* inoculada. Nos animais Fischer, o número de cistos cerebrais foi maior para a cepa NED, de baixa virulência, mas após inoculação em camundongos a cepa CT-1, genótipo I, relevou maior taxa de infecção, resultado semelhante ao obtido nesta pesquisa.

Assim, não só o genótipo da cepa está relacionado com a manutenção do parasita nos tecidos, mas também o efetivo fenótipo de virulência, visto que cepas de genótipo III podem ser de baixa e alta virulência para camundongos. Fica evidente, pela literatura, que a linhagem de ratos utilizada nos estudos experimentais influencia também a manutenção da infecção, fato que deve ser levado em consideração quando do delineamento do protocolo experimental.

5.3 Reação em cadeia pela polimerase

Os limiares de detecção encontrados neste trabalho para as diferentes seqüências-alvo do genoma de *T.gondii* refletem o número de vezes em que cada gene estudado repete-se no genoma do parasita. Outros trabalhos utilizando as mesmas seqüências, mesmo que com oligonucleotídeos de seqüências de bases diferentes e várias condições de componentes e ciclos de reação, obtiveram muitas vezes limiares de detecção menores. Entretanto, deve-se ressaltar que a detecção dos produtos amplificados pode diferir consideravelmente com a técnica utilizada neste trabalho, uma vez que muitos protocolos valem-se de hibridização do produto amplificado com sondas radioativas, enzimáticas ou fluorescentes, ou utilizam técnicas de reamplificação do produto amplificado, como a *nested-PCR*.

Para a detecção do gene SAG-1 a literatura descreve limiares de detecção de 0,03 a 10 e até 200 parasitas por amostra, em protocolos utilizando-se a hibridização^{49,66,67} ou detecção pelo brometo de etídeo⁴⁹, respectivamente. Utilizando a *nested-PCR*, Savva *et al.*⁴⁹ e Nguyen *et al.*³⁷ encontraram limiares de um e dois parasitas, respectivamente. Ressalta-se que Savva *et al.*⁴⁹ demonstraram que os oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene SAG-1 de *T.gondii* não amplificou DNA proveniente de *Hammondia*, *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Eimeria*.

O gene B1 até o momento é o mais utilizado em procedimentos moleculares para o diagnóstico da toxoplasmose. O limiar de detecção encontrado para esta sequência varia de 64 a 100 parasitas na PCR³⁵, apesar de Franzen *et al.*⁶⁸ apontarem um limite de detecção de 20 parasitas em 100µl de sangue. Nos protocolos de PCR seguidos de hibridização do produto amplificado com sondas, este limite é reduzido para 0,045 a um parasita em solução tampão^{50,69}, a dez ou 100 parasitas na presença de leucócitos e amostras de sangue, respectivamente^{50,70}. Já a *nested-PCR* para o gene B1 foi capaz detectar de um a dez parasitas nos trabalhos de Joss *et al.*, Cingolani *et al.* e Lappin *et al.*^{35,71,72} Burg *et al.*⁵⁰ apontaram a especificidade desta sequência, já que a sonda específica para o gene B1 não hibridizou com DNA proveniente de *Sarcocystis*, *Neospora*, *Plasmodium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* e *Absidia*.

Frente ao gene SAG-1 e ao gene B1, a detecção das seqüências de rDNA trazem a vantagem de serem mais repetidas no genoma do *Toxoplasma*, cerca de 110 vezes em contraste com uma e 35 cópias dos genes SAG-1 e B1, respectivamente. Os limiares de detecção encontrados na literatura tornam a sua utilização tentadora, entretanto, estas seqüências carregam consigo a possibilidade de amplificar também o DNA de microrganismos filogeneticamente relacionados ao *Toxoplasma*, tais como *Sarcocystis*, *Hammondia* e *Neospora*. Na PCR foram encontrados limiares de um a cinco parasitas, mesmo na presença de células contaminantes⁷³⁻⁷⁵, enquanto que a utilização da hibridização dos produtos amplificados reduziu o limiar para a detecção do DNA correspondente a 0,01 parasita⁷⁴.

Preocupados com o potencial de baixa especificidade da seqüência, Tenter *et al.*⁵¹, testaram diversos oligonucleotídeos e condições de reação, na expectativa de selecionar parâmetros que possibilitassem a identificação sensível e específica do *T.gondii*, diferenciando o mesmo das quatro espécies de *Sarcocystis* que afetam os ovinos. Utilizando condições de alta estringência, a sensibilidade destes oligonucleotídeos foi de 0,1ng de DNA de *T.gondii*, correspondendo a cerca de 1000 parasitas. Diminuindo a estringência da reação, pela utilização de concentrações de cloreto de magnésio $\geq 1,5\text{mM}$ e 36 ciclos de amplificação resultou em sensibilidade 100x maior que as observadas anteriormente, mas neste caso não foi possível distinguir *T.gondii* das

espécies de *Sarcocysts* estudadas. Neste trabalho utilizou-se concentração de cloreto de magnésio de 1,5mM, e 35 ciclos de reação, que apesar de melhorar a sensibilidade do par de oligonucleotídeos, podem amplificar o DNA de outros parasitas correlatos ao *Toxoplasma*.

A seqüência repetida descrita por Homan *et al.*³⁴ não hibridizou com DNA humano ou murino, bem como com DNA de *Echinococcus granulosus*, *Giardia duodenalis*, *Plasmodium falciparum*, *Sarcocystis* spp, *Trichinella spiralis*, *Trichomonas vaginalis* e *Neospora caninum*. A sensibilidade foi de cinco fg do DNA de *Toxoplasma* em comparação a um limite de 25fg para PCR-B1, ou quatro parasitas diluídos em líquido amniótico contra 40 parasitas para a PCR-B1. Nesta pesquisa foi também a mais sensível, revelando um limiar de detecção mais baixo que os outros oligonucleotídeos testados, bem como um melhor desempenho com as amostras de tecidos dos ratos.

O desempenho dos diferentes oligonucleotídeos na detecção do *Toxoplasma* frente aos resultados do reisolamento em camundongos, variou principalmente de acordo com o tecido examinado, sendo normalmente baixa a concordância do reisolamento em camundongos com a PCR para os genes SAG1, B1 e do rDNA nas amostras de musculatura. Poucos trabalhos apontam concordância entre o reisolamento em camundongos e a PCR, havendo normalmente maior número de positivos nesta última.

O desempenho da PCR-SAG1 foi normalmente pobre, devido ao seu elevado limiar de detecção. Quando utilizada em protocolos que aumentam a sensibilidade da detecção, o desempenho desta sequência tende a melhorar. Savva *et al.*⁴⁹ utilizaram *nested*-PCR-SAG-1 em amostras de sangue e tecidos murinos. O parasita foi detectado em 11 de 12 fluidos peritoneais e em uma de 12 amostras de sangue cardíaco de animais na fase aguda, e em 21 (72,4%) de 29 amostras de cérebro examinadas, mas em nenhuma das amostras de sangue, nos animais na fase crônica da infecção.

van de Ven *et al.*⁷⁶ utilizando a PCR-B1 seguida de hibridização com sonda específica e o isolamento em camundongos e células Hep-2, estudaram a presença de *T.gondii* em um caso humano pós-transplante e em três casos de toxoplasmose congênita. No caso pós-transplante, a PCR foi positiva em cérebro, músculo e coração, corroborando os dados do isolamento em camundongos, e positiva também em amostra de linfonodo. O isolamento em células foi positivo apenas em músculo e coração. Nos casos congênitos, a PCR foi positiva nas amostras de líquido e também em cérebro, onde o isolamento em camundongo também detectou o parasita.

Owen *et al.*⁷⁷ inocularam ovelhas com 1500 oocistos de *T.gondii*, realizando a sorologia das ovelhas e fetos abortados, bem como o isolamento em camundongos e a *nested*-PCR-B1. A sensibilidade da

PCR foi de dez parasitas em amostras de 500mg de cotilédone. Na maioria dos casos a PCR e o isolamento em camundongos tiveram resultados concordantes. Em um caso o cotilédone de um cordeiro que nasceu vivo foi positivo no isolamento em camundongos e negativo na PCR, provavelmente devido a distribuição esparsa dos parasitas nos tecidos, e em outros três casos, o isolamento foi negativo e a PCR positiva, provavelmente devido a morte dos parasitas, detectáveis então somente pela PCR.

Warnekulasuriya *et al.* ⁷⁸ investigaram a presença de *T.gondii* em 67 amostras de produtos cárneos diversos, usando a *nested*-PCR para o gene SAG-1 e pelo isolamento em células HEL. O teste de sensibilidade com amostras artificialmente contaminadas com cistos ou taquizoítos de *T.gondii* apontou um limite de 10^3 a 5×10^3 taquizoítos por grama de amostra para o isolamento e a PCR, e para cistos, 50 a 70/g para o isolamento e para a PCR, respectivamente. O isolamento foi particularmente afetado pela atividade citopática intrínseca da carne curada. Das amostras examinadas, um presunto produziu uma PCR positiva, com detecção ao parasita no isolamento. A sensibilidade dos ensaios demonstra que a amostra positiva teria uma contaminação $\geq 5 \times 10^3$ taquizoítos/g, provavelmente suficiente para a contaminação do homem, o que espelha os riscos de infecção humana, também a partir de produtos cárneos.

Fricker-Hidalgo *et al.*⁷⁹ utilizaram o isolamento em células MRC-5 e em camundongos, diversos exames sorológicos e a PCR para o gene B1, para a detecção da infecção pelo *Toxoplasma* em amostras de placentas humanas. O isolamento em células foi positivo em 37,5% dos casos confirmados de toxoplasmose congênita, em 18% dos casos suspeitos, e negativo em todos os casos sabidamente negativos. O isolamento em camundongos foi positivo em 54,3% dos casos congênitos, em 45,5% dos suspeitos e negativo em 96,3% e 100% dos casos considerados negativos, dependendo do critério utilizado. A PCR foi positiva em 66,6% dos casos congênitos, em 54,4% dos casos suspeitos e negativa em 81,8% e 100% dos casos considerados negativos. A detecção do *T.gondii* na placenta foi realizada em 66,6% dos casos confirmados ou suspeitos, e em 8,2% dos casos negativos. A detecção de IgM no neonato foi positiva em 82,7% dos casos confirmados, o que não ocorreu em nenhum caso negativo, enquanto que a síntese de IgG foi detectada em 82,7% dos confirmados e em 1,8% dos negativos. Em cinco casos considerados negativos, o parasita ou o seu DNA foi detectado na placenta: nos casos com PCR positiva, a detecção de DNA, sem isolamento concomitante, pode ser devido à influência da espiramicina ou eventual contaminação laboratorial; nos casos com isolamento, o parasita pode ter se instalado na placenta sem infecção fetal, ou esta ocorreu sem soroconversão, devido provavelmente ao tratamento utilizado.

Homan *et al.*³⁴ examinaram treze líquidos amnióticos humanos, nove sem isolamento em camundongos, enquanto que os demais foram positivos. Nestes casos à PCR, tanto B1 quanto REP, foram positivas em duas amostras, exatamente as mesmas onde o número de camundongos que soroconverteram foi maior. Eles assinalam que a diferença entre o isolamento e a PCR pode se prender ao tamanho da amostra, 50µl para a PCR contra 500µl no isolamento. No presente trabalho, sete amostras positivas ao isolamento foram negativas a PCR-REP, e nestes casos a diferença de volume de amostra utilizada para o isolamento, 1mL, e para a extração de DNA, 250µl, pode ter contribuído para estes resultados.

Outras condições que podem levar a discrepância de resultados entre a PCR e outros métodos de diagnóstico da toxoplasmose, são as condições de armazenamento das amostras e do inóculo utilizado na infecção experimental.

Esteban-Redondo & Innes³⁹ inocularam ovinos com 10^3 , 10^4 e 10^5 oocistos da cepa M3, colhendo amostras de sangue dos três aos 14 DPI, e colheita de amostras de cérebro, coração e músculo para a PCR e a histologia aos 40 DPI. Na PCR, usaram a detecção do gene B1 seguida de hibridização. Nas amostras de sangue dos animais que receberam 10^5 oocistos, a PCR apontou a presença do parasita entre o 2º e 10º DPI, enquanto que nos animais que receberam 10^4 oocistos foi

sempre negativa, e positiva aos nove DPI nos animais que receberam 10^3 oocistos. A histologia dos tecidos foi sempre negativa. A PCR foi positiva em oito (66,66%) dos doze animais inoculados. A distribuição dos resultados foi de três, dois e zero positivos dos quatro cérebros examinados dos animais inoculados com 10^5 , 10^4 e 10^3 oocistos, respectivamente. No coração a PCR foi positiva em três, um e dois dos quatro órgãos examinados dos animais que receberam 10^5 , 10^4 e 10^3 oocistos, respectivamente. Apontam, entretanto, que quantidade de tecido examinado é fator crucial para a detecção, e que um resultado negativo de determinada amostra não significa necessariamente que todo o tecido esteja livre do parasita. O problema de erro de amostragem quando se trabalha com grandes espécies animais poderia ser evitado somente se todo o animal fosse examinado, o que é claramente impraticável.

Esteban-Redondo *et al.*⁴⁰ inocularam pela via oral, ovinos e bovinos com 10^3 ou 10^5 oocistos da cepa M3 de *T.gondii*. Visando a detecção do parasita, colheram amostras de cérebro, medula espinhal, músculo cardíaco, músculo esquelético, fígado, linfonodo mesentérico, pulmão e rim, para exame histológico. Tentaram o isolamento também pela inoculação em camundongos de amostras de um a três gramas de cérebro, coração e músculo, e também a PCR para o gene B1, seguida de hibridização. Dos ovinos que receberam 10^3 oocistos, dois dos quatro inoculados revelaram PCR positiva no sangue periférico aos sete e oito

DPI. Dos que receberam 10^5 oocistos, um foi positivo aos seis e sete DPI, dois aos sete e dez DPI, e um terceiro aos dois, sete e 14 DPI. Nos bovinos, a PCR de sangue periférico foi positiva apenas aos dois DPI em cinco dos seis animais, e aos seis DPI em três dos seis animais inoculados com 10^5 oocistos. Ao isolamento, dos ovinos que receberam 10^3 oocistos, esta foi possível em uma amostra de coração. Na dose de 10^5 , o isolamento foi positivo em todos os tecidos examinados, pelo menos em um ovino, mas nos demais, mais frequentemente no coração. Na dose de 10^5 , o isolamento foi positivo no cérebro de um dos três bovinos inoculados. Seis meses à inoculação, o isolamento foi possível somente nos ovinos, com maior frequência no coração, cérebro e músculo. A positividade para a PCR foi mais frequente nos animais que receberam 10^5 oocistos, ressaltando-se que a amostra de coração de um ovino inoculado com 10^3 oocistos foi positiva. Quanto aos bovinos, nenhuma amostra apresentou-se positiva à prova de PCR.

Como referido anteriormente com relação ao isolamento, a resposta do animal inoculado pode estar relacionada às condições específicas do parasita, em função da sua virulência. Neste estudo a manutenção do agente nos diferentes tecidos, relacionou-se com a sua virulência do mesmo, pois nas amostras de musculatura, tanto o isolamento quanto a PCR apresentaram maior frequência de negativos para a cepa ME-49, que é de baixa virulência para camundongos.

Joss *et al.*³⁵ utilizaram a *nested*-PCR para o gene B1 em amostras de sangue de camundongos experimentalmente infectados com as cepas RH, genótipo I, e Beverley, genótipo II. Nas amostras dos animais experimentalmente infectados a *nested*-PCR foi positiva em 11 (73,3%) dos 15 ratos silvestres inoculados com a cepa RH ou com a cepa Beverley. Já em camundongos, a *nested*-PCR foi positiva em 18 (90,0%) de 20 animais inoculados com a cepa RH e em 15 (62,5%) dos animais com a cepa Beverley.

Nguyen *et al.*³⁷ utilizaram a *nested*-PCR para a detecção do gene SAG-1, seguida de visualização dos produtos amplificados em agarose ou pelo ELISA (PCR-DEIA), em amostras de sangue, urina e cérebro de camundongos experimentalmente infectados com a cepa Beverley, pela via oral, ou pela cepa RH, pela via intraperitoneal. Os resultados foram comparados com o isolamento em células MRC-5. Das 24 às 48 horas PI, a PCR e o isolamento foram positivas em urina e sangue dos animais infectados com a cepa RH, sem detecção de anticorpos séricos ou do parasita no cérebro. Nos animais infectados com a cepa Beverley a detecção no sangue se deu do 4^o até o 13^o DPI, com resultados similares para a PCR e o isolamento. O ELISA detectou anticorpos apenas a partir do 11^o DPI, e as amostras de urina foram sempre negativas. No cérebro destes camundongos o parasita foi detectado a partir do 6^o DPI até o 525^o DPI.

Ficou evidente com os resultados desta pesquisa, que o oligonucleotídeo utilizado na PCR teve influência na eficiência desta técnica na detecção do parasita nas amostras de cérebro e musculatura. Em geral a literatura aponta que as seqüências repetidas do genoma de *Toxoplasma* são mais sensíveis na detecção do parasita.

Wastling *et al.*³⁸ compararam protocolos de detecção do gene SAG-1 e do gene B1, em amostras de linfa, sangue e tecidos de ovinos experimentalmente infectados com taquizoítos da cepa S48. Ambos os protocolos utilizaram reações do tipo *nested*, e foram comparados com os resultados do isolamento em camundongos, para as amostras de linfa, e com o ELISA para a detecção de anticorpos séricos. Na linfa eferente, das 101 amostras testadas, 29 foram positivas ao isolamento, 30 na PCR-B1 e 20 na PCR-SAG-1. Quando consideradas todas as amostras, houve concordância de 87% entre o isolamento e a PCR-B1, e de 79% entre o isolamento e a PCR-SAG-1. Considerando-se apenas as 29 amostras com isolamento positivo, a concordância foi de 79% para a PCR-B1 e de 52% para a PCR-SAG-1. Os dois métodos de PCR diferiram significativamente. Nas amostras de sangue, a PCR-B1 detectou o parasita já no terceiro DPI, mas com maior consistência do sexto ao décimo-primeiro DPI. A SAG-1 detectou apenas a partir do sétimo DPI, com freqüência menor. O ELISA detectou anticorpos apenas a partir do décimo-primeiro DPI. Nas amostras de tecidos, o parasita foi detectado apenas nos linfonodos, pelas duas PCRs.

Paugam *et al.*³⁶ inocularam camundongos Swiss com 20 cistos da cepa C, isolada de humano, de baixa patogenecidade para camundongos. Os animais foram sangrados às 12, 24, 36 e 48 horas PI, e aos quatro, sete, 11, 21 e 30 DPI, e as amostras submetidas a PCR para o gene B1 e para seqüência repetida TGR1_E, bem como pelo isolamento em células MRC-5. Enquanto o isolamento foi sempre negativo, a PCR B1 foi positiva do 2^o ao 7^o DPI, e a PCR-TGR1_E do 2^o ao 21^o DPI.

Ellis³³ revisou a utilização da PCR para a detecção de *T.gondii*, apontando seu uso como diagnóstico em vários tipos de amostras de origem humana, tais como material de amniocentese, humor aquoso, lavados broncoalveolares, sangue, biópsias cerebrais, liquor e tecidos fixados pela formalina. Sua utilização durante a gravidez demonstra que a PCR tem resultados comparáveis, senão superiores que outros testes disponíveis. Apesar de animador, seu uso deve ser associado à outras técnicas como a sorologia, isolamento em camundongos ou células, imunohistoquímica, além dos dados clínicos. Como ainda não existe um teste comercial, vários protocolos baseados na detecção do gene B1 tem sido utilizados, com resultados variáveis. A utilização de seqüências com maior repetição que o gene B1 deveria ser analisada, pois poderia incrementar a utilização no diagnóstico, como demonstrado em relação a seqüência descrita por Homan *et al.*³⁴.

Apesar das vantagens da PCR na detecção do *Toxoplasma* em determinadas amostras e situações, o trabalho de Pelloux *et al.*⁸⁰ mostra que há a necessidade de padronização de métodos para manter a fidedignidade dos resultados, bem como da implantação de sistemas de certificação laboratorial e avaliação dos resultados.

5.4 Tipagem da cepa BTU-2 de *T.gondii*

A tipagem das cepas de *T.gondii* reveste-se de importância nos estudos epidemiológicos, verificando a distribuição dos diferentes clones do parasita entre as populações animais e humanas¹⁰, mas também para servir de referência nos protocolos de experimentação animal, evoluindo-se da simples avaliação da virulência para o camundongo. Como exemplo, a cepa BTU-2 utilizada neste trabalho, cuja tipagem apontou como sendo pertencente ao genótipo III, mas com característica de alta virulência para o camundongo, produzindo neste ascite, com grande número de taquizoítos após período de três a quatro dias da inoculação intraperitoneal.

Em geral a literatura aponta que as cepas tipo II e III são de baixa virulência para camundongos⁸¹, mas outras três cepas, também isoladas de cães em nosso laboratório, apresentaram genótipo III e alta virulência para camundongos, apesar delas não produzirem líquidos ascíticos ricos em parasitas, e apresentarem período de estado maior,

ocorrendo a morte dos animais em média de dez a doze dias após a inoculação. Dubey *et al.*⁸² isolaram *T.gondii* de 22 (75%) de 29 galinhas sororreagentes ao método de aglutinação direta, verificando que a maioria das cepas apresentaram genótipo I, enquanto que nove isolamentos eram do tipo III. Em cinco destes isolamentos, a taxa de mortalidade dos camundongos no isolamento primário foi de 100%, com os óbitos ocorrendo com uma média variável de 13,2 até 22,3 dias.

A associação entre genótipo e manifestações clínicas, seja no homem ou nos animais, não é direta, pois a frequência de genótipos nas populações infectadas, de forma subclínica, ainda não foi estabelecida. Desta maneira depreende-se a importância do estudo dos genótipos envolvidos nos casos de toxoplasmose em animais, visto que nestes casos é possível reisolar o parasita de tecidos de animais e produtos de origem animal utilizados para a alimentação humana. Na espécie canina este estudo também é importante, pois como apontam Germano *et al.*⁸³ e Jackson *et al.*⁸⁴, estes animais podem servir como sinalizadores da contaminação ambiental pelo *Toxoplasma*, e o risco consequente para a população humana, já que tanto o homem quanto os cães estão expostos a fontes comuns de infecção, representadas pelo ambiente e pelos alimentos.

Ainda são poucos os trabalhos de genotipagem de cepas de origem animal. Howe & Sibley³ analisaram o polimorfismo de seis

locus distintos para determinar padrões genéticos de 106 amostras de *T.gondii*, sendo 27 de pacientes com AIDS e encefalite toxoplásmica, 41 de pacientes humanos sem AIDS e 34 provenientes de animais. A maioria apresentou perfil denominado genótipo II, com 50 (47,17%) amostras neste grupo, enquanto que 24 foram classificadas como genótipo III (22,64%) e 15 como I (14,15%). Houve correlação entre genótipo e o hospedeiro, com o genótipo I sendo mais frequente nos casos congênitos humanos, o II nos casos de reativação devido a AIDS e o III com maior frequência nos isolados de animais. Mondragon *et al.*⁹ verificaram maior frequência de cepas de genótipo II (83,7%) em relação ao genótipo III (16,3%) na análise de 43 isolamentos de *T.gondii* provenientes de suínos, apontando a ausência de cepas do genótipo I.

Owen & Trees¹⁰ encontraram apenas o genótipo II de *T.gondii* em tecidos provenientes de 13 abortamentos ovinos, bem como do cérebro de dois ratos silvestres e de dois corações de cordeiros naturalmente infectados. Ressaltam que, uma vez que a maioria das infecções humanas são derivadas de infecções em animais, a investigação do genótipo de *Toxoplasma* em carnes e em casos de doença animal podem proporcionar informações importantes ao associar os genótipos que ocorrem tanto em casos animais, quanto nos humanos. Dubey *et al.*⁸² apontam a predominância de cepas de genótipo I em galinhas provenientes do Brasil, apontando a discrepância deste achado com o já registrado na literatura. Examinando 71 amostras de produtos

cárneos, Aspinall *et al.*⁸⁵ encontraram 27 amostras positivas, sendo que destas, 21 (77,78%) pertenciam ao genótipo I, enquanto que as restantes estavam contaminadas com parasitas dos genótipos I e II.

Examinar nossa origem nos protoctistas leva-nos à humildade. Não há como negar nosso parentesco com esse tipo de matéria viva. Os seres humanos são colônias integradas de seres amebóides, assim como os seres amebóides – os protoctistas – são colônias integradas de bactérias. Querendo ou não, viemos do lodo.

Lynn Margulis & Dorion Sagan, O Que é Vida?

6 CONSIDERAÇÕES

FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O encontro de diferenças na resposta dos ratos Fischer frente à cepas de características genotípica e fenotípicas distintas, mostrou a importância de padronização do modelo experimental antes de se transpor os resultados para outras espécies, inclusive a humana. Estas diferenças ficaram evidentes nos três métodos de avaliação utilizados: o exame sorológico, o reisolamento em camundongos e a reação em cadeia pela polimerase.

A cepa BTU-2, a despeito da caracterização como genótipo III, descrito pela literatura mundial como de baixa virulência para camundongo, persistiu nos tecidos, induzindo resposta de anticorpos de maior intensidade. Já a cepa ME-49, concordando com o caracterizado na literatura, teve uma persistência menor nos tecidos, notadamente na musculatura, com influência da dose infectante.

A influência da cepa utilizada também ficou evidente na curva sorológica, já que os animais inoculados com a cepa de baixa virulência desenvolveram títulos de anticorpos mais baixos, como reflexo da atuação do sistema imune sobre o parasita, o que também influenciou na recuperação do *T.gondii* dos tecidos, seja pelo reisolamento em camundongos como pela reação em cadeia pela polimerase.

A reação em cadeia pela polimerase em amostras de tecido demonstrou, principalmente no caso da sequência repetida (REP) uma performance satisfatória, ainda que aquém dos resultados obtidos pelo reisolamento em camundongos. As vantagens dos métodos moleculares sobre o isolamento em camundongos refletem-se principalmente no menor tempo para o diagnóstico e na possibilidade de utilização em materiais impróprios para o isolamento, entretanto para a avaliação da infecção crônica pelo *T.gondii*, os métodos atualmente disponíveis não são ainda plenamente satisfatórios, principalmente pela distribuição irregular dos cistos parasitários nos tecidos.

Desta forma a utilização do rato como modelo experimental para a infecção pelo *T.gondii* no homem deve ser ponderada levando em questão as características de resposta da linhagem de rato utilizada, como demonstra a literatura, e da cepa inoculada, como mostrou esta pesquisa.

A despeito desta ponderação, se os experimentos levarem em conta estes parâmetros, principalmente estudando-se o efeito da inoculação de cepas de genótipos diferentes, este modelo pode representar um avanço no estudo da resposta imune ao parasita, bem como em modelos de imunodepressão natural e induzida, e também para avaliações terapêuticas, notadamente em pacientes imunodeprimidos e infectados por outros agentes patogênicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Tenter AM, Johnson AM. Phylogeny of the tissue cyst-forming Coccidia. *Adv Parasitol.* 1997; 39: 70-141.
2. Tenter AM. Current knowledge on the epidemiology of infections with *Toxoplasma*. *Tokai J Exp Clin Med.* 1999; 23: 391.
3. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* 1995; 172: 1561-66.
4. Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Exp Rev Mol Med.*, [serial online], 2001; [cited 2001]. Available from: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002204h.htm>.
5. Freyre A, Correa O, Falcon J, Mendez J, Gonzalez M, Venzal JM. Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. *Parasitol Res.* 2001; 87: 941-44.
6. Fuentes I, Rubio JM, Ramírez C, Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1566-70.

* As referências bibliográficas seguem as normas sugeridas pelo *International Committee of Medical Journal Editors* ("Vancouver"): *International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals.* *Ann Intern Med.* 1997; 126: 36-47.

A inserção das referências foi realizada utilizando-se o programa *Reference Manager Version 10* (ISI Research Soft, 2001).

7. Honoré S, Couvelard A, Garin YJF, Bedel C, Hénin D, Dardé ML, Derouin F. Génotypage de souches de *Toxoplasma gondii* chez des patients immunodéprimés. *Pathol Biol.* 2000; 48: 541-47.
8. Parmley SF, Gross U, Sucharczuk A, Windeck T, Sgarlato GD, Remington JS. Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 1994; 80: 293-301.
9. Mondragon R, Howe DK, Dubey JP, Sibley LD. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *J Parasitol.* 1998; 84: 639-41.
10. Owen MR, Trees AJ. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. *J Parasitol.* 1999; 85: 382-84.
11. Lehmann T, Blackston CR, Parmley SF, Remington JS, Dubey JP. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. *J Parasitol.* 2000; 86: 960-971.
12. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food related illness and death in the United States. *Emerg Inf Dis.* 1999; 5: 607-25.
13. Smith JL. Long-term consequences of foodborne toxoplasmosis: effects on the unborn, the immunocompromised, the elderly, and the immunocompetent. *J Food Protec.* 1997; 60: 1595-611.
14. Zenner L, Darcy F, Capron A, Cesbron-Delauw MF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp Parasitol.* 1998; 90: 86-94.
15. Dubey JP, Frenkel JK. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Vet Parasitol.* 1998; 77: 1-32.
16. De Champs C, Pelloux H, Dechelotte P, Giraud JC, Bally N, Ambroise-Thomas P. *Toxoplasma gondii* infection in rats by the RH strain: inoculum and age effects. *Parasite.* 1998; 5: 215-18.

17. Ruchman I, Fowler JC. Localization and persistence of *Toxoplasma* in tissues of experimentally infected white rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1951; 76: 793-96.
18. Chinchilla M, Alfaro M, Guerrero OM. Adaptación natural de rata blanca a *Toxoplasma gondii*. *Rev Biol Trop*. 1981; 29: 273-82.
19. Dubey JP, Shen SK, Kwok CH, Frenkel JK. Infection and immunity with the RH strain of *Toxoplasma gondii* in rats and mice. *J Parasitol*. 1999; 85: 657-62.
20. Weinman D, Chandler AH. Toxoplasmosis in swine and rodents. Reciprocal oral infection and potential human hazard. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1954; 87: 211-16.
21. Schlüter D, Hein A, Dörries R, Deckert-Schlüter M. Different subsets of T cells in conjunction with Natural Killer cells, macrophages, and activated microglia participate in the cerebral immune response to *Toxoplasma gondii* in athymic nude and immunocompetent rats. *Am J Pathol*. 1995; 146: 999-1007.
22. Henry L, Beverley JKA. Toxoplasma in rats and guinea-pigs. *J Comp Pathol*. 1977; 87: 97-102.
23. Dubey JP. Comparative infectivity of *Toxoplasma gondii* bradyzoites in rats and mice. *J Parasitol*. 1998; 84: 1279-82.
24. Guerrero OM, Chinchilla M, Castro A, Abrahams E. Age influence in the natural resistance of white rat and mice to the protozoan *Toxoplasma gondii*. *Rev Biol Trop*. 1995; 43: 27-30.
25. Dubey JP. Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. *J Parasitol*. 1996; 82: 951-56.
26. Dubey JP. Distribution of tissue cysts in organs of rats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol*. 1997; 83: 755-57.

27. Lundes MN, Jacobs L. Toxoplasma hemagglutination and dye test antibodies in experimentally infected rats. J Parasitol. 1963; 49: 932-36.
28. Remington FS, Hackman R. Changes in serum proteins of rats infected with *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. 1965; 51: 865-70.
29. Calderón C, Thiermann E. Evolución de la infección experimental por *Toxoplasma gondii* en ratas inoculadas con dos cepas de diferente virulencia. Bol Chil Parasitol. 1973; 28: 10-14.
30. Zhi-hui G, Cheng-yan H, Yong-sheng Z, Shu-hong L, Jun D, Li L, Yan-qiu F, Gang Z, Jia-he L. Detection of DNA of *Toxoplasma gondii* in rat by using polymerase chain reaction. Chin J Parasitol Parasitc Dis. 2001; 19: 173-75.
31. Godard I, Darcy F, Deslee D, Dessaint JP, Capron A. Isotypic profiles of antibody responses to *Toxoplasma gondii* infection in rats and mice: kinetic study and characterization of target antigens of immunoglobulin A antibodies. Infec Immun. 1990; 58: 2446-51.
32. Cornelissen AWCA, Overdulve JP, van der Ploeg M. Determination of nuclear DNA of five eucoccidian parasites, *Isospora* (*Toxoplasma*) *gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E.acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis in *I.(T.)gondii*. Parasitol. 1984; 88: 531-53.
33. Ellis JT. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 1998; 28: 1053-60.
34. Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int J Parasitol. 2000; 30: 69-75.

35. Joss AWL, Chatterton JMW, Evans R, Ho-Yen DO. *Toxoplasma* polymerase chain reaction on experimental blood samples. J Med Microbiol. 1993; 38: 38-43.
36. Paugam A, Dupouy-Camet J, Sumuyen M-H, Romand S, Lamoril J, Derouin F. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by polymerase chain reaction in perorally infected mice. Parasite. 1995; 2: 181-84.
37. Nguyen TD, De Kesel M, Bigaignon G, Hoet P, Pazzaglia G, Lammens M, Delmee M. Detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in blood, urine, and brains of infected mice. Clin Diagn Lab Immunol. 1996; 3: 635-39.
38. Wastling JM, Nicoll S, Buxton D. Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. J Med Microbiol. 1993; 38: 360-365.
39. Esteban-Redondo I, Innes EA. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. Int J Parasitol. 1998; 28: 1459-66.
40. Esteban-Redondo I, Maley SW, Thomson K, Nicoll S, Wright S, Buxton D, Innes EA. Detection of *T.gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. Vet Parasitol. 1999; 86: 155-71.
41. Lin D-S, Su W-L. Comparison of four diagnostic techniques for detecting *Toxoplasma gondii* infection in cats, dogs and humans. Acta Zool Taiwanica. 1997; 8: 3-13.
42. Camargo ME. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1964; 6: 117-18.
43. Desmonts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: Method for increasing sensitivity and specificity. J Clin Microbiol. 1980; 11: 562-68.

44. Dubey JP. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet Parasitol.* 1998; 74: 75-77.
45. Coles EH. *Patologia Clínica Veterinária*. 3 ed. São Paulo: Manole, 1984.
46. Dubey JP, Beattie CP. *Toxoplasmosis of animals and man*. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, 1988.
47. da Silva AV, Langoni H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Vet Parasitol.* 2001; 97: 191-98.
48. Kwok S. Procedures to minimize PCR-product carry-over. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press; 1990: 142-45.
49. Savva D, Morris JC, Johnson JD, Holliman RE. Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J Med Microbiol.* 1990; 32: 25-34.
50. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 1787-92.
51. Tenter AM, Luton K, Johnson AM. Species-specific identification of *Sarcocystis* and *Toxoplasma* by PCR amplification of small subunit ribosomal RNA gene fragments. *App Parasitol.* 1994; 35: 173-88.
52. Prince JB, Auer KL, Huskinson J, Parmley SF, Araujo FG, Remington JS. Cloning, expression, and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 1990; 43: 97-106.
53. Triola MF. *Introdução à estatística*. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999.
54. Mackinnon A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. *Comp Biol Med.* 2000; 30: 127-34.

55. Fujii H, Kamiyama T, Hagiwara T. Species and strain differences in sensitivity to *Toxoplasma* infection among laboratory rodents. Jap J Med Sc Biol. 1983; 36: 343-46.
56. Kempf MC, Cesbron-Delauw MF, Deslee D, Gross U, Herrmann T, Sutton P. Different manifestations of *Toxoplasma gondii* infection in F344 and LEW rats. Med Microbiol Immunol (Berl). 1999; 187: 137-42.
57. Paulino JP, Vitor RW. Experimental congenital toxoplasmosis in Wistar and Holtzman rats. Parasite. 1999; 6: 63-66.
58. Uggla A. *Toxoplasma gondii* in farm animals. Some diagnostic methods and their potential use. Tese Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, 1986.
59. Eyles DE. Serologic response of white rats to *Toxoplasma* infection. J Parasitol. 1954; 40: 77-83.
60. De Champs C, Imbert-Bernard C, Belmeguenai A, Ricard J, Pelloux H, Brambilla E, Ambroise-Thomas P. *Toxoplasma gondii*: in vivo and in vitro cystogenesis of the virulent RH strain. J Parasitol. 1997; 83: 152-55.
61. Dubey JP, Shen SK, Kwok CH, Thulliez P. Toxoplasmosis in rats (*Rattus norvegicus*): congenital transmission to first and second generation offspring and isolation of *Toxoplasma gondii* from seronegative rats. Parasitol. 1997; 115: 9-14.
62. Jacobs L, Melton ML. The distribution of *Toxoplasma gondii* in the muscles of rats with chronic infections. J Parasitol. 1957; 43: 41-42.
63. Guerrero OM, Chinchilla M. *Toxoplasma gondii* (Eucoccidia: Sarcocystidae) dissemination pattern in rats after oral infection with oocysts of an avirulent strain. Rev Biol Trop. 1997; 44-45: 131-35.

64. Dubey JP. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. *Parasitol*. 1997; 115 (Pt 1): 15-20.
65. Freyre A, Falcon J, Correa O, Mendez J, Gonzalez M, Venzal JM. Residual infection of 15 toxoplasma strains in the brain of rats fed cysts. *Parasitol Res*. 2001; 87: 915-18.
66. Weiss LM, Udem SA, Salgo M, Tanowitz HB, Wittner M. Sensitive and specific detection of toxoplasma DNA in an experimental murine model: use of *Toxoplasma gondii*-specific cDNA and the polymerase chain reaction. *J Infect Dis*. 1991; 163: 180-186.
67. Dupouy-Camet J, de Souza SL, Maslo C, Paugam A, Saimot AG, Benarous R, Tourte-Schaefer C, Derouin F. Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 1866-69.
68. Franzen C, Altfeld M, Hegener P, Hartmann P, Arendt G, Jablonowski H, Rockstroh J, Diehl V, Salzberger B, Fätkenheuer G. Limited value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in blood from human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 2639-41.
69. Filice GA, Hitt JA, Mitchell CD, Blackstad M, Sorensen SW. Diagnosis of *Toxoplasma* parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 2327-31.
70. Stiles J, Prade R, Greene C. Detection of *Toxoplasma gondii* in feline and canine biological samples by use of the polymerase chain reaction. *Am J Vet Res*. 1996; 57: 264-67.
71. Cingolani A, de Luca A, Ammassari A, Murri R, Linzalone A, Grillo R, Antinori A. PCR detection of *Toxoplasma gondii* DNA in CSF for the

- differential diagnosis of AIDS-related focal brain lesions. J Med Microbiol. 1996; 45: 472-76.
72. Lappin MR, Burney DP, Dow SW, Potter TA. Polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor of cats. Am J Vet Res. 1996; 57: 1589-93.
73. Aouizerate F, Cazenave J, Poirier L, Verin P, Gervais C, Lagoutte F, Begueret J. Détection directe de toxoplasmes dans l'humeur aqueuse par amplification génique (PCR). J Franç Ophtalmol. 1991; 14: 550-555.
74. Cazenave J, Broussin B, Cambeilh C, Discamps G. [Rapid detection of toxoplasma by "Polymerase Chain Reaction". Contribution to prenatal diagnosis]. Presse Med. 1992; 21: 221.
75. MacPherson JM, Gajadhar AA. Sensitive and specific polymerase chain reaction detection of *Toxoplasma gondii* for veterinary and medical diagnosis. Can J Vet Res. 1993; 57: 45-48.
76. van de Ven E, Melchers W, Galama J, Camps W, Meuwissen J. Identification of *Toxoplasma gondii* infections by B1 gene amplification. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2120-2124.
77. Owen MR, Clarkson MJ, Trees AJ. Diagnosis of toxoplasma abortion in ewes by polymerase chain reaction. Vet Rec. 1998; 142: 445-48.
78. Warnekulasuriya, Michelle R., Johnson JD, Holliman RE. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. Int J Food Microbiol. 1998; 45: 211-15.
79. Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, Racinet C, Grefenstette I, Bost-Bru C, Goullier-Fleuret A, Ambroise-Thomas P. Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placentae from infected women by polymerase chain reaction, in vivo, and in vitro cultures. Placenta. 1998; 19: 545-49.
80. Pelloux H, Guy E, Angelici MC, Aspöck H, Bessièrès M-H, Blatz R, Del Pezzo M, Girault V, Gratzl R, Holberg-Petersen M, Johnson J, Krüger D,

- Lappalainen M, Naessens A, Olsson M. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. FEMS Microbiol Letters. 1998; 165: 231-37.
81. Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd, John C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. Science. 2001; 294: 161-65.
82. Dubey JP, Graham DH, Blackston CR, Lehmann T, Gennari SM, Ragozo AMA, Nishi SM, Shen SK, Kwok OCH, Hill DE, Thulliez P. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. Int J Parasitol. 2002; 32: 99-105.
83. Germano PML, Erbolato EB, Ishizuka MM. Estudo sorológico da toxoplasmose canina pela prova de imunofluorescência indireta na cidade de Campinas, 1981. Rev Fac Med Vet Zoot Univ São Paulo. 1981; 22: 53-58.
84. Jackson MH, Hutchison WM, Siim JC. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in meat animals, cats and dogs in Central Scotland. Br Vet J. 1997; 143: 159-65.
85. Aspinall TV, Marlee D, Hyde JE, Sims PFG. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction - food for thought? Int J Parasitol. 2002; 32: 1193-99.

ANEXOS

8 ANEXO A – Parecer de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CÂMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

BOTUCATU, SP - RUBIÃO JÚNIOR - CEP 18618-970 - PABX (014) 820-6143 - FAX (014) 821-2202

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 112 sobre o projeto de pesquisa intitulado "Toxoplasmose Experimental em Ratos (*Rattus Norvegicus*). Avaliação da Resposta Sorológica, da Bioprova e Comparação de Oligonucleotídeos na reação em cadeia pela polimerase (PCR)", sob a responsabilidade de Aristeu Vieira da Silva, com a colaboração dos Professores Helio Langoni e Jussara Marcondes Machado, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os ratos são provenientes de Biotério convencional, sem condições de emitir atestado de Sanidade.

Projeto de pesquisa aprovado em 26 de junho de 2.000

Botucatu, em 26 de junho de 2.000


Prof. Dr. Antero Frederico M. Miranda
Presidente


Alberto Santos Capelluppi
Secretário

9 ANEXO B – Lista de materiais utilizados

Reagente	Marca	Código
Acetato de sódio	Sigma	S7545
Ácido bórico	Gibco BRL	15583-016
Ácido clorídrico	Synth	30650
Ácido etilenodiaminotetracético	Gibco BRL	15576-028
Agarose	Gibco BRL	15510-019
Azul de bromofenol	Sigma	B6131
Azul de Evans	FlukaAG	46160
Azul de metileno	Vetec	598
Brometo de etídeo	Gibco BRL	15585-011
Cloreto de magnésio	Sigma	M1028
Cloreto de sódio	Synth	-
Conjugado anti-IgG murina	Sigma	F5262
Conjugado anti-IgM de rato	Bethyl Laboratories	A110-100F
Conjugado anti-IgG de rato	Bethyl Laboratories	A110-105F
Deoxinucleotídeos	Gibco-BRL	10219-012
Dextran (PM=200.000 – 300.000)	ICN Biomedicals	101514
Enzima de restrição <i>Sau3A</i> I	Amersham Pharmacia Biotech	E1082Y
Enzima de restrição <i>Hha</i> I	Amersham Pharmacia Biotech	E1056V
Estreptomicina base	Wieth	-
Etanol PA	Merck	
Fenol	Gibco-BRL	15513-039
Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1)	Gibco-BRL	15593-031
Formaldeído	Synth	F1019
Fosfato de potássio	Vetec	225
Fosfato de sódio monohidratado	Reagen	-
Fosfato dibásico de sódio	Synth	-
Glicerina PA	Ecibra	830

Reagente	Marca	Código
Glicerol	Gibco-BRL	15514-011
Marcador de peso molecular 100 bp	Gibco-BRL	15628-019
Metanol PA		
Nujol	Schering-Plough	-
Penicilina G potássica	Laboratório Farmacêutico	-
Pepsina	Merck	1.07185
Percoll	Pharmacia	17-0891-02
Oligonucleotídeos	Gibco-BRL	-
Proteinase K	Gibco-BRL	25530-015
Sacarose	Gibco BRL	15503-014
Sódio-dodecil-sulfato	Gibco-BRL	15553-027
Tampão para PCR	Gibco-BRL	18067-017
Taq-polimerase	Gibco-BRL	10342-053
Tripsina 1:250	Difco	0152
Tris(hidroximetil)aminometano	Gibco-BRL	15504-012

10 ANEXO C – Fórmulas de soluções e detalhamento dos métodos utilizados

10.1 Exame sorológico

Preparação de antígeno para a reação de imunofluorescência indireta

Manutenção da cepa RH de *T.gondii* para preparação de lâminas

A cepa RH de *T.gondii* foi mantida por inoculação intraperitoneal de camundongos Swiss, albinos, 30 g, semanalmente, com 0,5 ml de exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados. Dois dias após a infecção, os camundongos foram sacrificados e a cavidade peritoneal lavada com cinco ml de SSTF estéril. A presença de taquizoítos foi verificada pela observação do líquido aspirado em microscopia de campo claro sob objetiva de 40x. Os taquizoítos assim obtidos foram conservados sob refrigeração por até quinze dias, e utilizados na preparação de lâminas para a reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

Preparação de lâminas impregnadas com taquizoítos de *T.gondii*

Ao líquido obtido segundo o item “a” foi adicionado igual volume de SSTF adicionada de 5% de formaldeído PA, homogeneizado em tubo de ensaio com tampa de borracha e incubado a 37° C por 30 minutos, com agitação por leve inversão

do tubo a cada 10 minutos. Posteriormente a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1600 g, descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspendido em 2 ml de SSTF e centrifugado novamente por 10 minutos a 1600 g. Após desprezar-se o sobrenadante, o sedimento foi ressuspendido em 2 ml de SSTF, e examinado ao microscópio de campo claro sob objetiva de 40x, diluindo-se a suspensão até a obtenção de 20 a 30 parasitas por campo microscópico. Esta suspensão foi distribuída em volume de 10 µl em lâminas esmaltadas para microscopia, aspirando-se em seguida o excesso para formar uma película de fluido sobre a mesma. Estas lâminas foram secas ao ar, embrulhadas em papel alumínio e conservadas a -20°C até o momento do uso.

Preparação de antígeno para o método de aglutinação direta

Manutenção da cepa de sarcoma murino TG180

Após 12 dias da inoculação de camundongos albinos, Swiss, de 40 dias de idade, com fluido peritoneal de camundongos previamente inoculados com a cepa de sarcoma murino TG180, foram selecionados os animais com ascite acentuada. Os animais foram fixados em decúbito dorsal, desinfetando-se a região ventral com álcool iodado, coletando-se o líquido ascítico com o auxílio de uma seringa de 5 ml. Os líquidos ascíticos hemorrágicos foram desprezados, selecionando-se os de aspecto leitoso, ricos em células de sarcoma. Foram inoculados quatro novos camundongos Swiss, com idade entre 45 a 50 dias, com 0,2 ml do líquido ascítico recém-obtido, via intraperitoneal, para a manutenção da cepa.

Inoculação combinada de *T.gondii* e sarcoma TG180

Dois dias previamente à inoculação das células de sarcoma e de *T.gondii*, foi preparada uma suspensão-mãe de taquizoítos, colhendo-se o líquido peritoneal de cinco camundongos 48 horas após a inoculação com *T.gondii*, utilizando-se para a lavagem 10 ml de solução salina 0,9% estéril, por camundongo. Foram

selecionados, por observação à microscopia de campo claro, aumento de 400x, os fluidos ricos em parasitas e livres de contaminação bacteriana, hemácias e leucócitos. Foram inoculados 40 camundongos com 1 ml dos líquidos selecionados. Dois dias após os fluidos peritoneais foram obtidos por lavagem com 10 ml de solução salina 0,9% estéril. Paralelamente foram colhidos os líquidos ascíticos de três camundongos inoculados previamente com a cepa de sarcoma TG180 (com dez dias de inoculação), com auxílio de uma seringa de 10 ml estéril. Foram desprezados os líquidos ascíticos hemorrágicos e preparada a mistura de taquizoítos e células de sarcoma. O líquido ascítico tumoral foi diluído a 1:8 em solução fisiológica estéril e homogeneizado volume a volume (v/v) com a suspensão de *T.gondii*, para se obter um volume final de 120 ml de suspensão. Foram inoculados intraperitonealmente 120 camundongos com 1 ml desta suspensão por animal.

Obtenção e fixação dos taquizoítos para o método de aglutinação

Três dias após a inoculação, foram colhidos os exsudatos por lavagem, com 10 ml de solução salina 0,9% estéril por animal, observando-se individualmente ao microscópio de campo claro, desprezando-se aqueles contaminados com bactérias, com poucos taquizoítos ou células. Foram selecionados os fluidos ricos em parasitas de localização extracelular, mas ainda íntegros e aqueles ricos em células tumorais intensamente parasitadas, prestes a romper. Para lisar as células infectadas, adicionou aos fluidos selecionados, tripsina a uma concentração de 0,05%, incubando-se o material a 37°C sob agitação constante por cerca de 15 minutos, obtendo-se assim a liberação dos taquizoítos. À suspensão de taquizoítos purificados foi adicionado igual volume de solução de formalina tamponada a 6% (SFT), incubando-se a temperatura ambiente por 16 horas. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 1600 g por 5 minutos, sendo o sedimento ressuscitado em 10 ml de SST. Este procedimento foi repetido três vezes para eliminar a formalina, sendo o sedimento ressuscitado, após a última centrifugação em 10 ml de tampão borato pH 8,7 (STB). Os taquizoítos foram

contados em microscopia de campo claro sob objetiva de 40x, sendo a concentração ajustada para 10^8 taquizoítos por ml. A diluição de trabalho de cada lote de antígeno foi determinada pela titulação do mesmo frente a soros positivos e negativos, determinados pela RIFI, para anticorpos anti-*Toxoplasma*.

Solução salina tamponada de fosfatos, 0,01M, pH 7,2 (SST)

Cloreto de sódio	8,18 g
Fosfato monobásico de potássio	1,05 g
Fosfato dibásico de potássio	0,31 g
Água destilada	1.000 ml

Solução de Azul de Evans a 20 mg%

Solução-mãe

Azul de Evans	0,02g
SST, 0,01 M, pH 7,2	100 ml

Solução para uso (4 mg%), 1:5

Solução-mãe	1,00 ml
SST, 0,01 M, pH 7,2	4,00 ml

Solução de formalina tamponada 6%

Formaldeído	60,00 ml
Fosfato monobásico de sódio	4,00 g
Fosfato dibásico de sódio	4,50 g
Água destilada	940,00 ml

Solução tampão borato, pH 8,7

Cloreto de sódio	1,40 g
Ácido bórico (H_3BO_3)	0,62 g
Hidróxido de sódio 1N	4,80 ml
Albumina bovina	0,80 g
Água destilada	195,20 ml

Solução de 2-mercaptoetanol 0,2 M

2-mercaptoetanol	140,00 μl
Solução salina tamponada de fosfatos pH 7,2	10,00 ml

10.2 Isolamento em camundongos

Solução de Dextran 32,5%

Dextran (PM=200.000-300.000)	6,50 g
Solução salina tamponada de fosfatos pH 7,2	20,00 ml

Solução salina 0,18% com antibióticos (SSA)

Cloreto de sódio	0,18 g
Água destilada estéril	100 ml
Penicilina G	200.000 UI
Estreptomicina	20 mg

Solução de HCl-pepsina

Pepsina	5,20 g
Ácido clorídrico	14,00 ml
Cloreto de sódio	5,00 g
Água destilada estéril q.s.p.	1.000 ml

Solução de bicarbonato de sódio 1,2%

Bicarbonato de sódio	6,00 g
Água destilada	500 ml

Solução tampão de Sorensen, pH 7,0**Solução A**

Fosfato monobásico de sódio	11,87 g
Água destilada	1.000 ml

Solução B

Fosfato de potássio	9,07 g
Água destilada	1.000 ml

Homogeneizar as soluções A e B em partes iguais e ajustar o pH para 7,0

Solução de Giemsa

Formaldeído (37 a 40%)	100 ml
Azul de metileno	6,00 g
Glicerina PA	324,00 ml
Metanol PA	504,00 ml

10.3 Reação em cadeia pela polimerase

Solução estoque de Cloreto de Sódio 4 M

Cloreto de sódio	232,00 g
Água ultra-pura	1.000 ml

Solução estoque de Tris 1 M

Tris(hidroximetil)aminometano (Tris)	121,14 g
Água ultra-pura	1.000 ml

Solução estoque de EDTA 0,5 M

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)	186,12 g
Água ultra-pura	1.000 ml

Tampão Tris-NaCl-EDTA (TNE)

Solução estoque de NaCl 4 M	7,15 ml
Solução estoque de Tris 1 M	2,86 ml
Solução estoque de EDTA 0,5 M	14,20 ml
Água ultra-pura	75,79 ml

Solução de acetato de sódio 2M

Acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	27,22 g
Água ultra-pura	100 ml

Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 5x

Tris(hidroximetil)aminometano (Tris)	54,00 g
Ácido bórico	27,50 g
Solução estoque de EDTA 0,5 M	20,00 ml
Água destilada	980 ml

Gel de agarose a 2,0%

Agarose	0,60 g
Tampão TBE 5x	6,00 ml
Água destilada	24,00 ml

Solução de azul de bromofenol

Tris(hidroximetil)aminometano (Tris)	0,15 g
Azul de bromofenol	1,00 mg
Sacarose	4,00 g
Água	10,00 ml

Solução de brometo de etídeo

Brometo de etídeo	5,00 µl
Tampão TBE 5x	20,00 ml
Água destilada	80,00 ml

Diluição dos nucleotídeos (dNTP-set - Gibco)**Solução-mãe**

Misturar as quatro DNTps num microtubo (concentração 25mM)

Solução de uso

dNTPs (25 mM) – solução-mãe	50,00 µl
Água ultra-pura estéril	950,00 µl

Diluição do padrão de peso molecular (100bp DNA LADDER Gibco)

100bp DNA LADDER Gibco	10,00 µl
Solução de azul de bromofenol	20,00 µl
Água destilada	70,00 µl

Proteinase K (20 mg/mL)

Preparar uma solução de 20 mM de TrisHCl + 40 mM de CaCl₂:

TrisHCl	0,32 g
CaCl ₂	0,59 g
Água ultra-pura	100 mL

Diluir a proteinase K como abaixo:

Proteinase K	100 mg
Solução TrisHCL-CaCl ₂	2,50 mL
Glicerol	2,50 mL

Manter a -20°C.

Quadro de referência para os reagentes da PCR

Reagente	1 amostra	10 amostras
Água ultra-pura	15,2 µl	152,0 µl
PCRbuffer	5,0 µl	50,0 µl
dNTPs	8,0 µl	80,0 µl
MgCl ₂	1,5 µl	15,0 µl
Primer 01	5,0 µl	50,0 µl
Primer 02	5,0 µl	50,0 µl
Taq-polimerase	0,3 µl	3,0 µl

10.4 Genotipagem

Quadro de referência para os reagentes da tipagem

Reagente	1 amostra	10 amostras
Tampão [10x]	1,0 µl	10,0 µl
Albumina (1mg/ml)	1,0 µl	10,0 µl
Enzima (uma unidade)	0,1 µl	1,0 µl
Água ultra-pura	0,9 µl	9,0 µl

11 ANEXO D – Resultados individuais dos exames sorológicos

TABELA 9. Resultado do exame sorológico pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgM, anti-*T.gondii*, em soros de ratos experimentalmente infectados com 10^5 (Grupo 1), 10^4 (Grupo 2) e 10^3 bradizoítos (Grupo 3) de *T.gondii* cepa BTU-2. Botucatu, 2002.

Dias após a inoculação	Grupo 1						Grupo 2						Grupo 3					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	16	0	0	16	16	0	16	0	0	16	0	0	0	0	16	0	0
14	16	64	16	16	64	16	16	64	0	16	64	16	16	16	0	16	0	0
21	64	64	64	64	256	256	64	256	16	64	256	64	16	16	16	64	16	64
28	256	256	256	256	1024	256	256	1024	64	256	1024	256	64	64	64	64	16	64
35	64	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	1024	64	64	256	64	64	64
42	64	64	64	64	256	64	64	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	16
49	64	64	64	64	64	64	64	64	256	256	64	64	1024	64	1024	256	1024	1024
56	16	64	64	64	64	16	16	64	256	64	64	64	256	64	256	64	256	64
63	16	16	16	16	64	16	16	16	256	64	64	64	256	64	256	256	64	64
70	16	16	16	16	64	16	16	16	64	64	16	64	256	64	256	64	64	256
77	0	0	0	0	64	16	16	0	64	64	16	16	64	16	64	64	64	64
84	0	0	0	0	64	16	16	0	64	64	16	16	256	16	16	64	64	16

TABELA 11. Resultado do exame sorológico pelo método de aglutinação direta (MAD) para detecção de anticorpos anti-*T.gondii*, em soros de ratos experimentalmente infectados com 10^5 (Grupo 1), 10^4 (Grupo 2) e 10^3 bradizoítos (Grupo 3) de *T.gondii* cepa BTU-2. Botucatu, 2002.

Dias após a inoculação	Grupo 1						Grupo 2						Grupo 3					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	16	64	16	64	16	256	16	64	64	16	16	16	16	64	64	16	16	16
21	64	1024	256	256	16	1024	64	64	256	256	256	256	64	64	256	256	256	256
28	256	1024	256	1024	64	1024	256	256	4096	1024	4096	1024	256	256	4096	1024	4096	1024
35	1024	1024	1024	4096	256	4096	256	1024	4096	1024	4096	1024	256	1024	4096	1024	4096	1024
42	1024	1024	1024	4096	256	4096	1024	1024	4096	4096	4096	4096	1024	1024	4096	4096	4096	4096
49	4096	4096	4096	4096	1024	4096	1024	1024	4096	4096	4096	4096	1024	1024	4096	4096	4096	4096
56	4096	4096	4096	4096	1024	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096
63	16384	16384	4096	4096	65536	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096
70	16384	4096	4096	4096	65536	4096	4096	1024	4096	4096	4096	4096	4096	1024	4096	4096	4096	4096
77	4096	4096	4096	1024	1024	1024	4096	1024	4096	1024	1024	1024	4096	1024	4096	1024	1024	1024
84	4096	1024	1024	4096	1024	1024	4096	256	4096	1024	1024	1024	4096	256	4096	1024	1024	1024

TABELA 13. Resultado do exame sorológico pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG, anti-*T.gondii*, em soros de ratos experimentalmente infectados com 10⁵ (Grupo 4), 10⁴ (Grupo 5) e 10³ bradizoítos (Grupo 6) de *T.gondii* cepa ME-49. Botucatu, 2002.

Dias após a inoculação	Grupo 4						Grupo 5						Grupo 6					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0
14	16	16	16	16	0	64	0	16	16	16	0	0	0	64	16	0	0	16
21	64	64	64	16	64	64	16	256	64	16	0	16	64	64	16	16	64	16
28	64	256	64	64	16	64	16	256	64	16	64	16	64	16	64	64	64	256
35	256	256	256	64	256	64	64	256	256	64	64	64	256	64	256	64	64	64
42	256	64	64	256	246	64	64	256	256	64	64	64	64	16	16	16	64	64
49	64	64	64	64	64	64	64	256	64	16	64	64	64	16	16	16	256	64
56	64	256	64	64	64	64	64	256	64	16	16	16	16	0	64	16	64	64
63	64	64	256	64	64	64	64	64	256	16	16	16	16	0	16	0	16	64
70	64	256	64	64	16	16	64	64	256	16	16	16	16	0	16	0	16	64
77	16	64	64	64	64	64	16	16	64	16	0	16	16	0	16	0	16	16
84	16	64	64	16	64	16	16	16	64	16	0	0	16	0	16	0	16	16

TABELA 14. Resultado do exame sorológico pelo método de aglutinação direta (MAD) para detecção de anticorpos anti-*T.gondii*, em soros de ratos experimentalmente infectados com 10^5 (Grupo 4), 10^4 (Grupo 5) e 10^3 bradizoítos (Grupo 6) de *T.gondii* cepa ME-49. Botucatu, 2002.

Dias após a inoculação	Grupo 4						Grupo 5						Grupo 6					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	16	16	16	16	16	64	16	16	16	16	16	0	0	64	16	16	16	16
21	64	64	256	16	64	64	64	256	64	16	16	16	64	64	16	64	64	64
28	64	256	256	64	64	64	64	256	64	16	64	16	64	64	64	64	64	256
35	1024	256	256	64	256	64	256	256	256	64	64	64	256	256	246	64	64	256
42	256	256	64	256	256	256	256	256	256	256	64	64	64	64	64	64	64	64
49	64	64	64	64	64	64	256	256	64	64	64	64	64	16	64	16	256	64
56	64	64	64	64	64	64	64	256	64	64	64	64	16	16	64	16	64	64
63	64	64	64	64	64	64	64	64	256	64	64	64	16	16	16	16	16	64
70	64	64	64	64	16	16	64	64	256	64	16	64	16	0	16	0	16	64
77	16	64	16	64	64	16	16	16	64	16	16	16	16	0	16	0	16	16
84	16	64	64	16	64	16	16	16	64	16	16	16	16	0	16	0	16	16

